



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Rafael Kremer

**Efeitos do fenproporex sobre o comportamento hedônico e psicomotor em
ratas das linhagens SHR e SLA16**

Florianópolis – SC
2023

Rafael Kremer

**Efeitos do fenproporex sobre o comportamento hedônico e psicomotor em
ratas das linhagens SHR e SLA16**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador(a): Prof. Dr. Geison Souza Izídio

Florianópolis – SC

2023

Kremer, Rafael

Efeitos do fenproporex sobre o comportamento hedônico e psicomotor em ratas das linhagens SHR e SLA16 / Rafael Kremer; orientador, Geison Souza Izídio, 2023.

165 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. SHR. 3. SLA16. 4. Fenproporex. 5. Comportamento. I. Souza Izídio, Geison. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Rafael Kremer

**Efeitos do fenproporex sobre o comportamento hedônico e psicomotor
em ratas das linhagens SHR e SLA16**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 20 de dezembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Antonio de Pádua Carobrez

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Gabriel Adan Araujo Leite

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Pablo Pandolfo

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Geison Souza Izídio, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2024

Aos meus pais João Batista Kremer e Rosane Kremer.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Geison Souza Izídio (BEG/CCB) que me deu um voto de confiança e apoio incondicional em todas as etapas do trabalho, o que tem sido fundamental para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao professor Dr. Fábio Cardoso Cruz (UNIFESP) e às pesquisadoras Dr^a. Cristiane Aparecida Favoretto (UNIFESP) e Dr^a. Paula Cristina Bianchi (UNIFESP) que gentilmente me capacitaram para realização da técnica e análise de *western blot* e permitiram o uso dos espaços, insumos e equipamentos na UNIFESP.

Aos prezados colegas do LGC/UFSC, Aline Guimarães Pereira, Natalli Granzotto, José Ribamar Neto, Santiago Canepa Peralta e Gabriel Da Rocha Zurchimitten, pelos momentos compartilhados em eventos, discussões científicas, experimentos e de descontração. Às minhas colegas Julia Fernandez Puñal de Araújo e Ariela Maína Boeder que se dedicaram conjuntamente durante a manutenção e manejo do biotério do LGC/UFSC. Gostaria de agradecer especialmente ao pós-graduando Breno Raul Freitas de Oliveira pelo apoio na condução dos experimentos e pela amizade sincera e incondicional.

A todos os professores, técnicos e terceirizados da UFSC. Em especial, a Coordenação do PPGBCD que foi composta em maior parte pelos professores Dr. Geison Souza Izídio, Dr^a. Evelise Maria Nazari, Dr^a. Yara Costa Netto Muniz e Dr. Geisson Marcos Nardi.

À minha família pela compreensão, amor e apoio em todos os momentos da minha vida. Em especial aos meus pais, João Batista Kremer e Rosane Kremer, e tios, Valmor Pizzetti e Margarida Kremer Pizzetti. Minha ex-companheira Paula Tomasoni, que me acompanhou em parte dessa jornada e sempre me incentivou. A minha namorada, Cristiane Meneghelli, que me dá inspiração, companheirismo, amor e motivação.

Aos momentos vividos nesta época, incluindo a pandemia do coronavírus, a separação conjugal, os cortes no financiamento na pesquisa nacional e a solidão. Momentos que revelaram muito sobre minhas limitações e me fizeram refletir sobre o sentido da vida, das amizades, da família e das oportunidades.

RESUMO

O femproporex (FEN) foi o medicamento mais utilizado no tratamento da obesidade no Brasil. Durante o uso, relatos clínicos indicam que mulheres foram hospitalizadas, bem como apresentaram ansiedade, agitação, palpitações e insônia. Esses efeitos colaterais são atribuídos à metabolização do FEN em anfetamina, a qual apresenta potencial para o desenvolvimento de TUS (transtorno por uso de substância), com predisposição a indivíduos portadores de transtornos psiquiátricos como o transtorno por déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Considerando a linhagem ratos espontaneamente hipertensos (SHR) como modelo animal padrão-ouro no estudo do TDAH e a SHR.LEW-(D4Rat76 – D4Mgh11) (SLA16) que apresenta endofenótipos de desse transtorno ainda mais exacerbados, o presente trabalho avaliou os efeitos do FEN sobre o comportamento hedônico e psicomotor de ratas dessas linhagens. Nosso primeiro bloco experimental avaliou durante o tratamento repetido de FEN (4 mg/kg) a preferência por local condicionado (PLC), o comportamento emocional e motor, a regulação da tirosina hidroxilase (TH) e dos receptores dopaminérgicos tipo 1 e 2 (respectivamente, DRD1 e DRD2) no núcleo accumbens (NAc). Observamos que: SHR e SLA16 em estado livre de droga não apresentaram preferência aos compartimentos do PLC; SHR e SLA16 apresentaram PLC induzida por FEN e que o condicionamento ocorreu mais rapidamente na linhagem SLA16; o FEN promoveu maior emocionalidade no campo aberto (CA), mas não no labirinto em cruz elevado (LCE); no NAc o FEN aumentou a quantidade de TH e diminuiu a quantidade de DRD2, sem diferença entre linhagens; o FEN não alterou a quantidade de DRD1 no NAc das linhagens, mas foi menor nos SLA16. No segundo bloco experimental avaliamos o comportamento das ratas SHR e SLA16 15min após uma dose e 22±1h após uma dose de FEN. Observou-se: no teste de CA que as doses únicas foram capazes de modificar os comportamentos de exploração central, *grooming*, *sniffing* e movimentos verticais e que as linhagens responderam distintamente a alguns parâmetros analisados, assim como na 15min após a dose houve diminuição na locomoção e na aceleração de ratas SLA16; no LCE nenhuma diferença foi constatada. Por fim, um terceiro bloco experimental avaliou locomoção, peso, defecação e consumo de ração e água de ratas SHR e SLA16 que receberam FEN. Nesse observamos que: o FEN não modificou o peso dos animais, o consumo de água e ração, assim como, não houve diferença entre linhagens; na caixa de atividade o FEN aumentou a locomoção após a administração de uma dose, e produziu resposta locomotora distinta entre as linhagens durante doses repetidas; o FEN diminuiu a defecação dos animais na caixa de atividade locomotora mesmo após uma única dose. Concluímos que, em experimentos curtos, o FEN é capaz de promover alterações comportamentais sem perda de peso e modificação do consumo em ratas SHR e SLA16, e que as ratas das linhagens apresentaram respostas distintas aos parâmetros comportamentais analisados.

Palavras-chave: fenproporex; TDAH; TUS; ratos; comportamento; núcleo acumbens

ABSTRACT

Fenproporex (FEN) was the drug most used to treat obesity in Brazil. During use, clinical reports indicate that women have been hospitalized, as well as experiencing anxiety, agitation, palpitations and insomnia. These side effects are attributed to the metabolization of FEN into amphetamine, which has the potential to develop SUD (substance use disorder), predisposing individuals to psychiatric disorders such as attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Considering the spontaneously hypertensive rat (SHR) strain as the gold standard animal model for studying ADHD and the SHR.LEW-(D4Rat76 - D4Mgh11) (SLA16) strain, which has even more exacerbated endophenotypes of this disorder, the present study evaluated the effects of FEN on the hedonic and psychomotor behavior of rats from these strains. Our first experimental block assessed conditioned place preference (PLC), emotional and motor behavior, the regulation of tyrosine hydroxylase (TH) and type 1 and 2 dopamine receptors (DRD1 and DRD2, respectively) in the nucleus accumbens (NAc) during repeated FEN treatment (4 mg/kg). We observed that: SHR and SLA16 in a drug-free state showed no preference for PLC compartments; SHR and SLA16 showed FEN-induced PLC and that conditioning occurred more rapidly in the SLA16 strain; FEN promoted greater emotionality in the open field (AC), but not in the elevated cross maze (ECM); in the NAc, FEN increased the amount of TH and decreased the amount of DRD2, with no difference between strains; FEN did not alter the amount of DRD1 in the NAc of the strains, but it was lower in the SLA16. In the second experimental block, we assessed the behavior of SHR and SLA16 rats 15 minutes after a dose and 22±1 hours after a dose of FEN. It was observed: in the CA test that single doses were able to modify the behaviors of central exploration, grooming, sniffing and vertical movements and that the strains responded differently to some of the parameters analyzed, as well as at 15 minutes after the dose there was a decrease in locomotion and acceleration in SLA16 rats; in the LCE no difference was observed. Finally, a third experimental block evaluated locomotion, weight, defecation and consumption of food and water in SHR and SLA16 rats given FEN. In this, we observed that: FEN did not modify the animals' weight, water and feed consumption, nor was there any difference between the strains; in the activity box, FEN increased locomotion after the administration of one dose, and produced a distinct locomotor response between the strains during repeated doses; FEN decreased the defecation of the animals in the locomotor activity box even after a single dose. We conclude that, in short experiments, FEN is capable of promoting behavioral changes without weight loss and changes in consumption in SHR and SLA16 rats, and that the rats of the strains showed different responses to the behavioral parameters analyzed.

Keywords: fenproporex; ADHD; SUD; rats; behavior; nucleus accumbens

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias encefálicas envolvendo o VTA e a substância negra de roedores	32
Figura 2 – Geometria molecular do fenproporex	37
Figura 3 – Esquema do segundo desenho experimental	52
Figura 4 – Esquema do terceiro desenho experimental	53
Figura 5 – Esquema do quarto desenho experimental	54
Figura 6 – Esquema do quinto desenho experimental	55
Figura 7 – Aparato utilizado no teste do CA	56
Figura 8 – Sumarização do estudo etológico no CA	57
Figura 9 – Aparato utilizado no teste do LCE	58
Figura 10 – Aparato utilizado no teste de atividade locomotora	59
Figura 11 – Aparato utilizado no teste de PLC	60
Figura 12 – Esquema de um ensaio do teste de PLC	61
Figura 13 – Localização e coleta do NAc	62
Figura 14 – Sonicador e centrífuga utilizados na preparação da amostra	63
Figura 15 – Placa e espectrofotômetro utilizados na dosagem de proteínas	64
Figura 16 – Corrida das proteínas no gel e transferência para membrana	65
Figura 17 – Fêmeas SHR e SLA16 <i>naïve</i> testadas no aparato de PLC	66
Figura 18 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no compartimento droga do aparato de PLC	68
Figura 19 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no compartimento não-droga do aparato de PLC	69
Figura 20 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de CA (Dados 1)	71
Figura 21 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de CA (Dados 2)	72
Figura 22 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de CA (Dados 3)	73
Figura 23 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de CA (Dados 4)	74
Figura 24 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de LCE	75

Figura 25 – Quantificação dos níveis de TH de fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN	77
Figura 26 – Quantificação dos níveis de DRD1 de fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN	78
Figura 27 – Quantificação dos níveis de DRD2 de fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN	79
Figura 28 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de CA (Dados 1)	82
Figura 29 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de CA (Dados 2)	83
Figura 30 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de CA (Dados 3)	84
Figura 31 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de CA (Dados 4)	85
Figura 32 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de LCE	86
Figura 33 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 15min antes do teste no aparato de CA (Dados 1)	89
Figura 34 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 15min antes do teste no aparato de CA (Dados 2)	90
Figura 35 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 15min antes do teste no aparato de CA (Dados 3)	91
Figura 36 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 15min antes do teste no aparato de CA (Dados 4)	92
Figura 37 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose aguda de FEN testadas no aparato de LCE	94
Figura 38 – Locomoção de fêmeas SHR e SLA16 aos 50 dias de idade na caixa de atividade após a administração da primeira dose de FEN	96
Figura 39 – Defecação de fêmeas SHR e SLA16 aos 50 dias de idade na caixa de atividade após a administração da primeira dose de FEN	97
Figura 40 – Locomoção de fêmeas SHR e SLA16 aos 62 dias de idade na caixa de atividade após a administração de repetidas doses de FEN	98

Figura 41 – Defecação de fêmeas SHR e SLA16 aos 62 dias de idade na caixa de atividade após a administração de repetidas doses de FEN	99
Figura 42 – Acompanhamento do peso de fêmeas SHR e durante a administração de repetidas doses de FEN	100
Figura 43 – Acompanhamento do consumo de ração e água de fêmeas SHR e durante a administração de repetidas doses de FEN	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de LCE	76
Tabela 2 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de LCE	87
Tabela 3 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 15min antes do teste no aparato de LCE	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Efeito de tratamento

\$ - Efeito de Interação

* - Efeito de linhagem

6-OHDA - 6-hidroxidopamina

AMPc - Monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Anxrr16 – Anxiety-related response region 16

APA - *American Psychiatric Association*

ATP - Trifosfato de adenosina

BA - Braço aberto

BEG - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

BF - Braço fechado

CA - Campo aberto

CCB - Centro de Ciências Biológicas

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

CHR - Hormônio liberador de corticotropina

Chr4 – *Chromosome 4* (Cromossomo 4)

cm – Centímetro

CRHR2 - Receptor 2 do hormônio liberador de corticotropina

DA – Dopamina

DAT – *Dopamine transporter* (Transportador de dopamina)

DRD1 - *Dopamine receptor type 1* (Receptor de dopamina do tipo 1)

DRD2 - *Dopamine receptor type 2* (Receptor de dopamina do tipo 2)

DRD3 - *Dopamine receptor type 3* (Receptor de dopamina do tipo 3)

DRD4 - *Dopamine receptor type 4* (Receptor de dopamina do tipo 4)

DRD5 - *Dopamine receptor type 5* (Receptor de dopamina do tipo 5)

DSM - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

DSM-V - V Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EPM - Erro padrão da média

FEN – Fenproporex (ou Femproporex)

fMRI - ressonância magnética funcional

GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

(gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)

GRIN2A – *Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A*

(Subunidade 2A do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato)

GRIN2B – *Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A*

(Subunidade 2B do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato de glutamato)

h - Hora

i.p. - Intraperitoneal

kg - Quilograma

mg - Miligrama

LCE - Labirinto em cruz elevado

LEW - Lewis

LGC - Laboratório de Genética do Comportamento

m - Metro

MAO - Monoamina oxidase

Mpb – Mega pares de bases

min – Minuto

NA – Noradrenalina

NAc - Núcleo acumbens (*Nucleus accumbens*)

NET - *Norepinephrine transporter* (Transportador de noradrenalina)

NHE - Ratos de alta excitabilidade

NK1 - Receptor da neuroquinina-1

NPY - Neuropeptídeo Y

PLC - Preferência por local condicionado (ou preferência condicionada por lugar)

Pb - Pares de base

QTL - *Quantitative trait loci*

RGD - Região genômica diferencial

seg - Segundo

SHR - *Spontaneously hypertensive rat* (Rato espontaneamente hipertenso)

SLA16 - SHR.LEW-(D4Rat76 – D4Mgh11)

SNC - Sistema Nervoso Central

SP - Substância P

TDAH - Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade

TH - *Tyrosine hydroxylase* (Tirosina hidroxilase)

UFFS - Universidade Federal da Fronteira Sul

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

UNODC - Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime

VTA - Área tegumentar ventral do mesencéfalo

VEH - *Vehicle* (veículo)

VMAT2 - Transportador vesicular de monoamina tipo 2

WKY – Wistar kyoto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO	19
1.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
1.2.1	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)	23
1.2.1.1	<i>Dados epidemiológicos</i>	23
1.2.1.2	<i>Diagnóstico</i>	24
1.2.1.3	<i>Etiologia</i>	22
1.2.2	Transtorno por uso de substâncias (TUS)	27
1.2.2.1	<i>Dados epidemiológicos e generalidades</i>	27
1.2.2.2	<i>Diagnóstico</i>	28
1.2.2.3	<i>Comorbidade entre o TDAH e o TUS</i>	29
1.2.2.4	<i>Sistema dopaminérgico e via de recompensa</i>	31
1.2.3	Medicamentos	35
1.2.3.1	<i>TDAH e os medicamentos psicoestimulantes</i>	35
1.2.3.2	<i>Fenproporex (FEN)</i>	36
1.2.4	Modelos experimentais: Ratos de laboratório	39
1.2.4.1	<i>Ratos de laboratório na pesquisa de transtornos psiquiátricos</i>	39
1.2.4.2	<i>Linhagem SHR como modelo de TDAH</i>	40
1.2.4.3	<i>Linhagem SLA16 e a região genômica Anxrr16</i>	42
1.2.4.4	<i>Modelos experimentais no estudo do TUS</i>	44
1.2.4.5	<i>O uso de fêmeas no estudo de anorexígenos</i>	46
1.3	HIPÓTESES DO TRABALHO	48
1.3.1	Primeira hipótese	48
1.3.2	Segunda hipótese	48
1.3.3	Terceira hipótese	48
2	OBJETIVOS	49
2.1	OBJETIVO GERAL	49
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49

3	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1	ANIMAIS	50
3.2	MEDICAMENTOS, DOSAGEM E ADMINISTRAÇÃO	50
3.3	PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL	51
3.3.1	Experimento 1: Teste de permanência de animais em estado livre de drogas (naïve) nos compartimentos do aparato de preferência por local condicionado (PLC)	51
3.3.2	Experimento 2: Administração de repetidas doses de FEN	51
3.4	SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL	53
3.4.1	Experimento 3: Administração de FEN 22±1h antes dos testes	53
3.4.2	Experimento 4: Administração de FEN 15min antes dos testes	53
3.5	TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL	54
3.5.1	Experimento 5: Administração de repetidas doses de FEN	54
3.6	TESTES COMPORTAMENTAIS	55
3.6.1	Campo aberto (CA)	55
3.6.2	Labirinto em cruz elevado (LCE)	57
3.6.3	Caixa de atividade locomotora	58
3.6.4	Teste de preferência por local condicionado (PLC)	59
3.7	QUANTIFICAÇÃO DE TH, DRD1 E DRD2	62
3.7.1	Eutanásia e coleta do NAc	62
3.7.2	Preparação das amostras	63
3.7.3	Dosagem de proteínas totais	63
3.7.4	“Western blotting”	64
3.7.5	Peso, consumo de água e ração	65
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	65
4	RESULTADOS	66
4.1	PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL	66
4.1.1	Experimento 1: Teste de permanência de naïves nos compartimentos PLC	66
4.1.2	Experimento 2: Administração de repetidas doses de FEN	67

4.1.2.1	<i>Influência do FEN no teste de PLC</i>	67
4.1.2.2	<i>Influência do FEN no teste de CA: grupos de repetidas doses</i>	69
4.1.2.3	<i>Influência do FEN no teste de LCE: grupos de repetidas doses</i>	74
4.1.2.4	<i>TH, DRD1 e DRD2 do NAc: grupos de repetidas doses e naïve</i>	77
4.2	SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL	80
4.2.1	Experimento 3: Administração de dose única de FEN 22±1h antes	80
4.2.1.1	<i>Influência do FEN no CA: grupos tratados com dose única 22±1h antes</i>	80
4.2.1.2	<i>Influência do FEN no LCE: grupos tratados com dose única 22±1h antes</i>	85
4.2.2	Experimento 4: Administração de dose aguda de FEN 15min antes	87
4.2.2.1	<i>Influência do FEN no CA: grupos tratados com dose única 15min antes</i>	87
4.2.2.2	<i>Influência do FEN no LCE: grupos tratados com dose única 15min antes</i>	92
4.3	TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL	94
4.3.1	Experimento 5: Caixa de atividade após a administração aguda de FEN	94
4.3.2	Experimento 5: Caixa de atividade após a administração de repetidas doses de FEN	97
4.3.3	Experimento 5: Avaliação do peso dos animais	99
4.3.4	Experimento 5: Avaliação do consumo de ração e água	101
5	DISCUSSÃO	102
6	CONCLUSÕES	122
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	123
	REFERÊNCIAS	124
	APÊNDICE 1	160
	APÊNDICE 2	161
	APÊNDICE 3	162
	APÊNDICE 4	163
	APÊNDICE 5	164
	APÊNDICE 6	165

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o sobrepeso e a obesidade são condições evitáveis que aumentam os riscos à saúde de um indivíduo devido ao acúmulo anormal ou excessivo de gordura (RYAN *et al.*, 2021). Desde 1975, a prevalência destas condições quase triplicou e continua a aumentar em todo o mundo (BOUTARI; MANTZOROS; 2022; RYAN *et al.*, 2021; SCHETZ *et al.*, 2019). Grandes estudos de coorte na população em geral demonstraram um risco aumentado de desenvolvimento de comorbidades em indivíduos obesos (FIELD *et al.*, 2001; LENZ; RICHTWER; MÜHLHAUSEL, 2009). Nas mulheres, o estigma social, os distúrbios da imagem corporal e a discriminação podem promover e agravar o desenvolvimento de comorbidades, especialmente as neuropsiquiátricas (AZARBAD; GONDER-FREDERICK, 2010; NAPPO *et al.*, 2002).

O objetivo clínico do tratamento de indivíduos com sobrepeso e obesidade é reduzir o peso e os fatores de risco por meio de mudanças comportamentais, dieta nutricional e atividade física, com ou sem farmacoterapia ou cirurgia bariátrica (AZARBAD; GONDER-FREDERICK, 2010; GADDE; MARTIN; BERTHOUD, 2018; HEYMSFIELD; WADDEN, 2017). Para apoiar esse processo, as estratégias farmacêuticas utilizadas incluem inibidores de apetite que atuam na termogênese, saciedade, absorção e metabolismo da gordura (BRAY, 1999). No entanto, existe uma preocupação significativa por parte das autoridades reguladoras em relação à eficácia e a segurança destes medicamentos, uma vez que foi relatado que o uso destas substâncias aumenta a incidência de distúrbios comportamentais, abuso e dependência (CROLS *et al.*, 1993; HADLER, 1972; PÉLISSIER-ALICOT *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2002), particularmente em indivíduos geneticamente suscetíveis (AGRAWAL; LYNSKEY, 2008; TSUANG *et al.*, 1996) e pessoas com distúrbios neuropsiquiátricos (MCKETIN *et al.*, 2019; SARA *et al.*, 2015).

Dentre esses medicamentos para anorexia, o fenproporex (FEN), quimicamente conhecido como (±) N-2-cianoetilanfetamina, é o segundo mais utilizado no tratamento da obesidade em todo o mundo. (COHEN, 2009). Embora o FEN tenha sido desenvolvido para suprimir o apetite sem ter efeitos estimulantes, relatos clínicos indicam que mulheres foram hospitalizadas e apresentaram sintomas

como ansiedade, agitação, palpitações e insônia após seu uso (COHEN, 2009; NAPPO *et al.*, 2002; PÉLISSIER-ALICOT *et al.*, 2006; SMITH; COHEN, 2010). Esses efeitos colaterais têm sido atribuídos à metabolização do FEN em anfetamina (33 a 66%) (PAUMGARTTEN, PEREIRA, DE OLIVEIRA, 2016), que inibe a recaptação de dopamina (DA) e estimula a liberação neuronal de noradrenalina (NA) e DA no Sistema Nervoso Central (SNC) (COUTTS *et al.*, 1986; STĂCESCU *et al.*, 2020).

De fato, estudos experimentais demonstraram que a administração de FEN intraperitoneal (i.p.) em ratos resulta em altas concentrações de anfetaminas no cérebro após 5min, cujo pico é alcançado após 15min (COUTTS *et al.*, 1986). Além disso, demonstrou-se que o FEN (i.p.) em ratos jovens e adultos jovens altera a atividade da acetilcolinesterase (TEODORAK *et al.*, 2015) e da Na⁺, K-ATPase⁺ (REZIN *et al.* 2014), bem como o metabolismo energético no SNC (REZIN *et al.*, 2011). No entanto, resta saber se a exposição repetida ao FEN pode atuar no circuito de recompensa cerebral (via mesolímbica) de modo a promover o desenvolvimento de comportamentos hedônicos (prazerosos), de busca, agitação psicomotora e sensibilização comportamental (AGRAWAL; LYNSKEY, 2008; ROBINSON; BERRIDGE, 2001; TSUANG *et al.*, 1996). Faz-se necessário mais estudos controlados para essa avaliação uma vez que o uso de anfetaminas aumenta significativamente a liberação de DA da área tegmentar ventral do mesencéfalo (VTA) para o núcleo acumbens (NAc), promovendo efeitos hedônicos positivos.

O uso repetido de drogas psicoativas pode estar associado à dessensibilização do circuito de recompensa do cérebro e ao estabelecimento de um comportamento de adição (IVANOV *et al.*, 2022). Apesar da exposição repetida promover o surgimento de transtorno por uso de substância (TUS), a suscetibilidade ao desenvolvimento da dependência parece ser aumentada em indivíduos portadores de transtornos psiquiátricos, uma vez que há desarranjos preexistentes, estruturais e funcionais, no sistema de recompensa encefálico (GIGLIOTTI; GUIMARÃES, 2017). Por exemplo, a Federação Mundial de transtorno por déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), relata que os indivíduos portadores de TDAH têm um risco 50% maior de desenvolver um TUS do que aqueles que não são afetados (FARAONE *et al.*, 2021). Uma hipótese é que a busca por substâncias psicoativas aumenta a liberação de DA, a qual normalmente está diminuída no TDAH, e pode proporcionar alívio dos sintomas de desatenção e hiperatividade (BIEDERMAN *et al.*, 1995). No entanto, a patogênese das comorbidades em transtornos psiquiátricos como TDAH e

TUS permanece em grande parte desconhecida, fazendo-se necessário mais estudos em modelos animais (VENDRUSCOLO; IZIDIO; TAKAHASHI, 2009).

Nesse sentido, o Laboratório de Genética do Comportamento da Universidade Federal de Santa Catarina (LGC/UFSC), possui modelos animais promissores no estudo do potencial aditivo de compostos químicos e a sua inter-relação com o TDAH, as linhagens isogênicas de ratos SHR e SLA16 (GRANZOTTO, 2016; VENDRUSCOLO; IZIDIO; TAKAHASHI, 2009; VENDRUSCOLO *et al.*, 2008). A linhagem de ratos SHR representa atualmente o melhor modelo animal de TDAH validado, pois mimetiza os sintomas de desatenção (atenção sustentada prejudicada), hiperatividade e impulsividade (MILLER *et al.*, 2019; BORGÅ JOHANSEN *et al.*, 2005; VOLKOW *et al.*, 2009), bem como apresenta diminuição desses sintomas após o uso de medicação estimulante como o metilfenidato (MYERS; MUSTY; HENDLEY, 1982; SAGVOLDEN; XU, 2008; SAGVOLDEN *et al.* 2009; WULTZ *et al.*, 1990). Além do perfil comportamental característico da linhagem foi observada uma redução da liberação de DA no córtex pré-frontal e no NAc (RUSSELL, 2003a, 2003b) e uma suprarregulação dos receptores de DA no NAc (REGAN; WILLIAMS; VORHEES, 2022), o que a torna um modelo interessante para o estudo de TUS em comorbidade com o TDAH. Em estudos anteriores do LGC/UFSC observou-se que a linhagem SHR apresenta uma base genética de elevada sensibilidade a psicoestimulantes, opiáceos, canabinóides e etanol, sendo que fêmeas demonstraram maior sensibilidade à psicoestimulantes e consomem voluntariamente maior quantidade de solução de etanol do que machos (ANJOS *et al.*, 2022; PANDOLFO *et al.*, 2009; VENDRUSCOLO; IZIDIO; TAKAHASHI, 2009).

Porém, em termos de analogia e homologia dos comportamentos com o TDAH apresentados pela linhagem SHR, a linhagem SLA16 do LGC/UFSC apresenta maior reatividade motora ao longo da vida (ANSELMÍ *et al.*, 2016; DE MEDEIROS *et al.*, 2014; GRANZOTTO, 2022; PÉRTILE *et al.*, 2017), déficit de aprendizagem (ANSELMÍ *et al.*, 2016; VELÁZQUEZ *et al.*, 2019) e maior tomada de riscos em áreas aversivas dos aparatos, o que pode ser tomado como diminuição da emocionalidade e/ou impulsividade (RAMOS *et al.*, 2023). Nesse sentido, a hiper-reatividade motora e o comportamento impulsivo (BAILEY, 2023) podem prever um desequilíbrio de receptores dopaminérgico no NAc (estriado ventral) (KRAMER *et al.*, 2011; REGAN; WILLIAMS; VORHEES, 2022) que como resultado podem promover um comportamento de adição (BEVINS; KLEBAUR; BARDO, 1997; FOLL *et al.*, 2009;

HOOKS *et al.*, 1992; TU *et al.*, 2019; YATES *et al.*, 2012). A linhagem SLA16 também apresenta sensibilidade aumentada ao tratamento nos circuitos neurais dopaminérgicos, apesar de não se conhecer a região sensibilizada (PÉRTILE *et al.*, 2017). Todos estes fatores apontam a uma propensão do desenvolvimento de comportamentos aditivos, uma vez que a intensidade dos sintomas de pacientes com TDAH parece estar diretamente relacionada ao consumo de drogas que promovam a liberação de DA e conseqüente alívio dos sintomas (OHLMEIER *et al.*, 2008; RASMUSSEN; LEVANDER, 2009).

O estudo combinado das linhagens SHR e SLA16 ainda oferece a possibilidade de avaliar uma região genômica diferencial (RGD) específica do cromossomo 4 (Chr4), uma vez que a linhagem SLA16 apresenta exatamente o mesmo genótipo da linhagem SHR, com exceção de alelos da RGD do Chr4 (*locus Anxrr16, Anxiety-related response region 16*) que é da linhagem de ratos doadora Lewis (LEW). Em ratos o Chr4 está relacionado ao consumo e abuso de etanol (ANJOS *et al.*, 2022; CARR *et al.*, 2007; IZIDIO *et al.*, 2011; SPENCE *et al.*, 2018), sensibilização e dependência à cocaína (ENOCH *et al.*, 2012; VENDRUSCULO; IZIDIO; TAKAHASHI, 2009) e distúrbios neuropsiquiátricos (ANSELM I *et al.*, 2016; DE MEDEIROS *et al.*, 2014; PREDIGER *et al.*, 2018). Foi visualizado ainda que a expressão de genes do Chr4 no NAc foi diferente entre fêmeas muito e pouco bebedoras de ratos (SPENCE *et al.*, 2018), o que tem sido presenciado também em humanos (DEAK *et al.*, 2019; DICK; AGRAWAL, 2008). Uma vez que essas linhagens isogênicas de ratos estão submetidas aos mesmos controles ambientais e de manejo, esse modelo genético único de ratos permite avaliar a influência do *locus Anxrr16* no Chr4 em um possível comportamento aditivo.

Dentro deste contexto surgem as seguintes questões científicas: a) O tratamento repetido de FEN promove preferência condicionada de lugar (PLC) e modifica a expressão dos receptores dopaminérgicos do tipo 1 (DRD1) e do tipo 2 (DRD2) no NAc, distintamente em ratas SHR e SLA16?; b) Considerando a diferença genética das linhagens SHR e SLA16 (*locus Anxrr16*), uma única dose de FEN será capaz de promover mudanças comportamentais distintamente em ratas SHR e SLA16?; c) A locomoção e as medidas fisiológicas de peso, defecação, consumo de água e ração serão distintas entre fêmeas das linhagens de ratos SHR e SLA16, que receberem a administração de FEN?

1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.2.1 Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)

1.2.1.1 Dados epidemiológicos

O TDAH é uma das condições psiquiátricas mais comuns e desafiadoras observadas em crianças e adolescentes. É mais habitualmente diagnosticada em meninos do que em meninas, e acredita-se que a prevalência global entre pessoas com menos de 18 anos de idade seja de 5,6 a 7,2% (POLANCZYK *et al.*, 2007; THOMAS *et al.*, 2015). Estima-se que pelo menos algumas dessas crianças ou adolescentes continuarão a apresentar sintomas ou serão diagnosticados com este transtorno também na idade adulta (FAYYAD *et al.*, 2017; SIMON *et al.*, 2009).

A prevalência do TDAH em crianças e adolescentes possui estimativa distinta em diferentes países e culturas (SKOUNTI *et al.*, 2007). Por exemplo, foi observado em crianças e adolescentes, uma prevalência de TDAH de 6,1% na Alemanha (BACHMANN *et al.*, 2017), de 6,3% na Índia (CHAUHAN *et al.*, 2022), de 6,4 a 7,5% (área urbana e rural, respectivamente) na China (LIU *et al.*, 2018; PANG *et al.*, 2021) e de 9,4% nos Estados Unidos (DANIELSON *et al.*, 2018). Para além das características e especificidades regionais, essa variação na prevalência é, em grande parte, atribuída a diversidade de metodologias utilizadas na delimitação da população investigada e no estabelecimento dos critérios diagnósticos (CARDO *et al.*, 2011; GUARDIOLA *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2020; POLANCZYK *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2003). Por exemplo, em um contexto internacional, estudos que adotaram os critérios do V Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) para o diagnóstico de TDAH apresentaram um número maior de pessoas sendo diagnosticadas do que nas edições anteriores (GHANIZADEH, 2013; KIM *et al.*, 2020). No Brasil, infelizmente, pesquisas sobre a prevalência do TDAH têm-se apresentado insuficientes, uma vez que não há estudos abrangentes que contemplem amostras representativas de toda a população, mas sim levantamentos isolados em escolas ou comunidades específicas. Nesse sentido, Fontana e colaboradores (2007), juntamente a professores e pais, realizaram triagens diagnósticas em 461 alunos, de 6 a 12 anos, em quatro escolas públicas do Rio de Janeiro utilizando a DSM-IV, onde uma prevalência de 13% de TDAH foi constatada.

Já Oliveira e colaboradores (2016) analisaram 265 crianças e adolescentes, entre 10 a 17 anos, utilizando os critérios diagnósticos da DSM-V em uma escola pública de Salvador, onde observaram uma prevalência do transtorno de 16,6%. Estas estimativas vão ao encontro de outros relatórios internacionais, onde a prevalência de TDAH mostrou ser particularmente elevada em países da América do Sul (SINGH *et al.*, 2013). Estes dados indicam uma elevada prevalência mundial e regional, o que explica, ao menos em parte, o grande interesse da comunidade científica e dos profissionais de saúde em estudar este transtorno utilizando diferentes abordagens.

Diferenças na prevalência também têm sido observadas em relação ao sexo, dependendo dos critérios e ferramentas metodológicas utilizadas para diagnosticar o transtorno (CARDO *et al.*, 2011; WASCHBUSCH; KING, 2006). Embora a incidência de TDAH em meninas tem aumentado consistentemente nos últimos anos (BOYLE *et al.*, 2011), é provável que as mulheres com TDAH tenham sido subdiagnosticadas durante muitos anos devido ao menor número de critérios existentes nos instrumentos de diagnóstico de TDAH, que permitiam realizar uma avaliação diferencial (QUINN; MADHOO, 2014; NUSSBAUM, 2012; RUCKLIDGE, 2010). Os sintomas de TDAH em mulheres geralmente refletem desregulação emocional, levando a diagnósticos imprecisos de ansiedade, depressão e transtornos de humor (KOK *et al.* 2020; PIÑEIRO-DIEGUEZ *et al.*, 2016; QUINN; MADHOO, 2014). As meninas tendem a ser diagnosticadas mais tarde do que os meninos (GREVET *et al.*, 2006; QUINN; MADHOO, 2014; RUCKLIDGE, 2010) e parece não haver diferença significativa de prevalência entre os sexos na idade adulta (PIÑEIRO-DIEGUEZ *et al.*, 2016).

1.2.1.2 Diagnóstico

Indivíduos com TDAH apresentam transtornos de atenção e/ou hiperatividade/impulsividade que começam na infância e podem persistir na idade adulta em cerca de 50% dos indivíduos diagnosticados (BIEDERMAN; MICK; FARAONE, 2000; LEFFA, CAYE; ROHDE, 2022; SIMON *et al.*, 2009). O diagnóstico desse transtorno do neurodesenvolvimento é clínico e pode ser baseado no reconhecimento de sintomas e comportamentos comuns descritos no DSM-V da Associação de Psiquiatria Americana (APA, 2013). Ou seja, para ser diagnosticado com TDAH, dentro de uma grande lista de sintomas de desatenção ou hiperatividade-impulsividade, o indivíduo necessita apresentar ao menos seis sintomas se for criança

ou pelo menos cinco se for adulto (APA, 2013). Contudo, em alguns casos, é necessária a realização de diagnósticos diferenciais e a investigação adicional de parâmetros neuropsicológicos, comportamentais e psicométricos em diferentes cenários e fases do desenvolvimento, o que requer experiência clínica avançada, conhecimento teórico e, definitivamente, muita reflexão por parte dos especialistas (CARDO *et al.*, 2011; GRAEFF; VAZ, 2008; GUARDIOLA; FUCHS; ROTTA, 2000).

Em indivíduos com TDAH, a desatenção costuma ser identificada com maior frequência durante o ensino fundamental, manifestando-se como distração excessiva e dificuldade de manter o foco em determinados assuntos ou objetos, levando a dificuldades de aprendizagem e baixo rendimento acadêmico (BARKLEY *et al.*, 2006; FRANZIER *et al.*, 2007; RABINER, 2013). Na idade adulta, esta condição pode impactar negativamente sobre o desempenho da vida profissional, aumentar a probabilidade de desemprego e causar altos níveis de conflito interpessoal (AGARWAL *et al.*, 2012; BARKLEY *et al.*, 2006; VÖRÖS; LUKOVSKI, 2021). Os sintomas de hiperatividade geralmente aparecem na pré-escola sob a forma de inquietação ou agitação excessiva em diversos ambientes. Já a impulsividade refere-se a ações precipitadas, onde o indivíduo ao agir sem pensar pode adotar comportamento de risco frequente (BARKLEY *et al.*, 2006; LEFFA; CAYE; ROHDE, 2022). Ambos podem causar problemas no dia a dia das pessoas afetadas. Isso inclui questões como: problemas no convívio social, pois os indivíduos podem reagir de maneira acentuada a estímulos considerados normais; intromissão social devido a menores níveis de inibição comportamental; irritabilidade persistente; bem como maior busca por novidades e recompensas imediatas (APA, 2013; SANTOS; VASCONCELOS, 2010; RONALD *et al.*, 2021). Não bastassem esses sintomas, o TDAH ainda se apresenta, em muitos casos, em coexistência/comorbidade com outros transtornos de emocionalidade humanos, como ansiedade, depressão e o TUS (para revisão ver BIEDERMAN; FARAONE, 2005; DALRYMPLE *et al.*, 2020; FURMAN, 2005; SCHATZ; ROSTAIN 2006).

1.2.1.3 Etiologia

A patogênese do TDAH é altamente complexa e inclui fatores genéticos, neurobiológicos e ambientais que levam a uma expressão fenotípica heterogênea desse transtorno. Através de cálculos de herdabilidade realizados em estudos com

gêmeos, é possível estimar a proporção ou magnitude específica da contribuição dos fatores genéticos no TDAH. Esses estudos têm apresentado uma herdabilidade média de setenta e sete por cento, ou seja, é provável que os fatores genéticos predominem sobre os fatores ambientais que contribuem para o TDAH (BIEDERMAN; FARAONE, 2005). No entanto, as contribuições genéticas surgem de múltiplos genes de pequeno efeito, não sendo visualizadas variantes gênicas de grande efeito que predominem no TDAH idiopático (ACOSTA; ARCOS-BURGOS; MUENKE, 2004). Por exemplo, polimorfismos funcionais em genes do sistema monoaminérgico, incluindo receptores dopaminérgicos tipos 1, 4 e 5 (DRD1, DRD4 e DRD5), transportador de dopamina (DAT), receptores α -adrenérgicos, serotonina, proteínas sinápticas relacionadas à liberação de neurotransmissores (SNAP-25), bem como polimorfismo nos genes que codificam subunidades do receptor NMDA (GRIN2A e GRIN2B) (BIEDERMAN; FARAONE, 2005; DEMONTIS *et al.*, 2019; GENRO *et al.*, 2010). Combinações dessas e de outras variantes co-ocorrem como fatores de risco e predisõem ao TDAH.

Sabe-se também que vários fatores ambientais estão associados a um risco aumentado de desenvolvimento de TDAH idiopático, incluindo: pré-eclâmpsia, infecções infantis, exposição a drogas neurotóxicas durante a gravidez ou exposição materna a alguns vírus (BIEDERMAN; FARAONE, 2005; O'CONNOR *et al.*, 2002). Dessa forma, para o estudo pré-clínico tem sido desafiador a criação de modelos de animais com múltiplas mutações ou submetidos a diferentes fatores ambientais que modelem esse transtorno, sendo uma possibilidade a reprodução seletiva para o desenvolvimento de linhagens com essas características comuns (REGAN; WILLIAMS; VORHEES, 2022).

No nível neurobiológico do TDAH, já foram encontradas anormalidades estruturais do cérebro relacionadas ao transtorno, por exemplo, em áreas estriatais, lobos temporo-parietais, núcleos da base, tálamo, no corpo caloso, cerebelo e corpo amigdalóide (CORTESE, 2012). Além disso, foram descritas disfunções de neurotransmissores como, por exemplo, anormalidades nos níveis de DA e NA no córtex pré-frontal e no NAc (VOLKOW *et al.*, 2011). Estas parecem estar relacionadas com os prejuízos no controle inibitório, no controle executivo da atenção e motivação, que são sintomas do TDAH (SHARMA; COUTURE, 2014). Exames de ressonância magnética funcional (fMRI) também demonstram ativação reduzida do estriado durante uma tarefa de expectativa de recompensa em adolescentes com TDAH,

sugerindo prejuízo nas vias fronto-estriatais relacionadas ao reforço (SCHERES *et al.*, 2007).

1.2.2 Transtorno por uso de substâncias (TUS)

1.2.2.1 Dados epidemiológicos e generalidades

O TUS, antes especificados pelos termos “abuso” e “dependência” (DSM-IV), está associado a um sofrimento generalizado e a um elevado risco de morbidade e mortalidade (DEGENHARDT *et al.*, 2013; VAN ETTEN; ANTHONY, 1999; VSEVOLOZHSKAYA; ANTHONY, 2016). Os transtornos relacionados às substâncias legais e ilegais incluem as seguintes classes de drogas: álcool; cafeína; cannabis; alucinógenos (fenciclidina e outros alucinógenos); inalantes; opióides; sedativos, hipnóticos e ansiolíticos; estimulantes (substâncias tipo anfetamina, cocaína e outros estimulantes); tabaco; e outras substâncias (APA, 2013).

As últimas estimativas do *United Nations Office for Drug and Crime* (UNODC, 2022) mostram que o uso global não médico de substâncias proibidas pela Convenção Internacional sobre o Controle de Substâncias aumentou 26% em comparação com os dez anos anteriores. Parte deste aumento deve-se à inclusão de dados mais precisos e atualizados sobre a extensão do consumo de drogas em países densamente povoados. Mas de uma perspectiva econômica, política e de saúde, estes dados mostram que o impacto do consumo de drogas na população é mais profundo e abrangente do que se pensava anteriormente (HURST, 2019; TAVELLA *et al.*, 2020). Uma análise global do TUS incluindo heroína, cocaína, cannabis, drogas sintéticas, opiáceos e benzodiazepinas revela uma prevalência de substâncias do tipo anfetamina e opiáceos (DEGENHARDT *et al.*, 2013).

De acordo com o DSM-V, pessoas entre 18 e 24 anos apresentam taxas de prevalência relativamente altas de uso de praticamente todas as substâncias (APA, 2013). No Brasil, dados apontam que a experimentação ou exposição ao uso de drogas por adolescentes subiu de 8,2% em 2009 para 12,1% em 2019, o que é considerado grave (IBGE, 2019). Segundo “I Levantamento nacional sobre o uso de álcool, tabaco e outras drogas entre universitários das 27 capitais brasileiras”, as drogas psicotrópicas mais consumidas nos últimos 30 dias pelos universitários brasileiros foram o álcool (60,5%) e o tabaco (21,6%), seguidos pela maconha entre

os homens (13%) e substâncias do tipo anfetamina entre as mulheres (11,7%) (BRASIL, 2010). Sendo a intoxicação, normalmente, a primeira observação clínica do TUS e os principais dados sobre o atendimento de casos de intoxicação em nosso país provêm predominantemente de centros universitários de saúde (AMARAL; MALBERGIERI; DE ANDRADE, 2010).

O uso de drogas entre adolescentes é uma preocupação crescente para pais, colegas, comunidades e formuladores de políticas públicas. Esta preocupação justifica-se pelo fato da adolescência e o início da idade adulta serem um período de ontogenia em que os indivíduos exibem características comportamentais específicas da idade, como assumir riscos e buscar novidades, o que poderia predispor-los ao uso de drogas (CASEY *et al.*, 2008; DEGENHARDT *et al.*, 2016; SPEAR, 2000). Além disso, embora os adolescentes fumem menos cigarros do que os adultos, as taxas de dependência são mais elevadas. Em relação ao álcool, para consumos semelhantes durante a adolescência e na idade adulta, a dependência varia inversamente com a idade (CHAMBERS, TAYLOR, POTENZA, 2003). Sendo, portanto, a adolescência um período de vulnerabilidade à dependência de substâncias e que pode ter consequências em longo prazo, pois a exposição precoce às drogas durante o desenvolvimento cognitivo e emocional pode causar adaptações duradouras no SNC (GUERRIERO *et al.*, 2006, MCPHERSON; LAWRENCE, 2006). Estima-se que, conforme a substância de abuso e as vulnerabilidades individuais, aproximadamente 20 a 40% das pessoas desenvolvam o vício (VAN ETTEN; ANTHONY, 1999; VSEVOLOZHSKAYA; ANTHONY, 2016).

1.2.2.2 Diagnóstico

O TUS consiste na presença de um conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos nos quais o uso contínuo de substâncias tem prioridade sobre outros comportamentos de um indivíduo, apesar de problemas significativos (APA, 2013; SUGAYA *et al.*, 2022). Em outras palavras, é um distúrbio crônico e recidivante caracterizado pelo desejo compulsivo e perda do controle em relação à limitação do uso da droga (VAN ETTEN; ANTHONY, 1999; VSEVOLOZHSKAYA; ANTHONY, 2016). O diagnóstico e/ou a quantificação dos sintomas desse transtorno pode ser baseado no reconhecimento de padrões patológicos de comportamento de uso da substância (DIEHL; CORDEIRO;

LARANJEIRA, 2019). No DSM-V os critérios para ter TUS são classificados em grupos de baixo controle, declínio social, uso perigoso/arriscado e critérios farmacológicos (APA, 2013).

O baixo controle sobre o uso da substância caracteriza-se pelo fato do indivíduo: consumir a substância em maiores quantidades ou por tempo mais longo do que o pretendido; falhar ao diminuir ou descontinuar o uso da substância; gastar uma quantidade significativa de tempo obtendo, usando ou recuperando-se dos efeitos; desejar intensamente ou necessitar utilizar a substância (denominado de fissura). A fissura ocorre com maior probabilidade quando em um ambiente onde a droga foi usada anteriormente, pois envolve condicionamento clássico e está associada à ativação de estruturas específicas do circuito recompensa encefálico (APA, 2013).

O prejuízo social é decorrente do uso recorrente de substâncias e pode resultar: no fracasso em cumprir as principais obrigações diárias; em problemas persistentes de convívio interpessoais ou sociais; no abandono ou redução de atividades sociais, ocupacionais ou recreativas importantes; em afastamento de atividades em família. O uso perigoso/arriscado deve-se ao fato de o uso repetido representar risco à integridade física ou psicológica, levando-se em consideração a consciência do indivíduo e a não resistência ao uso (APA, 2013; GIGLIOTTI; GUIMARÃES, 2017).

Os critérios farmacológicos incluem a tolerância e a abstinência. A tolerância ocorre quando são necessárias quantidades cada vez maiores de uma substância para atingir o mesmo nível de intoxicação, ou quando os efeitos produzidos pela ingestão de uma dose habitual de uma substância são significativamente menores. Abstinência é uma síndrome que ocorre devido a diminuição da concentração da substância no organismo que estava sob o uso intensivo em longo prazo (APA, 2013; KOOB; ARENDS; LE MOAL, 2014).

1.2.2.3 Comorbidade entre o TDAH e o TUS

Conforme Diehl, Cordeiro e Laranjeira (2019), a comorbidade entre os transtornos psiquiátricos graves e o TUS é elevada. O que é observado entre o TDAH e TUS. Esses distúrbios muitas vezes se sobrepõem e interagem, e o TDAH demonstrou ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de TUS

(BIEDERMAN *et al.*, 1995, GIGLIOTTI; GUIMARÃES, 2017; LEE *et al.*, 2011; VAN EMMERIK-VAN OORTMERSSEN *et al.*, 2012). Em um estudo de caso-controle com 240 crianças, os indivíduos portadores de TDAH tinham duas vezes mais probabilidade de desenvolver TUS em comparação aos controles correspondentes (BIEDERMAN *et al.*, 2005). Numa meta-análise incluindo 13 estudos de coorte, Charach e colaboradores (2011) observaram que o TDAH manifestado na infância está associado a distúrbios relacionados ao uso de álcool e de outras drogas na idade adulta, da mesma maneira que o uso de nicotina durante a adolescência. Além disso, a co-ocorrência de TDAH têm um impacto negativo no curso do TUS. Indivíduos com TDAH desenvolvem precocemente o TUS, utilizam maior quantidade de substâncias, assim como são hospitalizados mais frequentemente do que pacientes com TUS não portadores de TDAH (ARIAS *et al.*, 2008). O TDAH também está correlacionado com elevação das taxas de recidiva ao uso após um tratamento bem-sucedido do TUS (CARROLL; ROUNSAVILLE, 1993). E, observou-se que 39,1% dos pacientes com TDAH apresentam o TUS em comorbidade (PIÑEIRO-DIEGUEZ *et al.*, 2016).

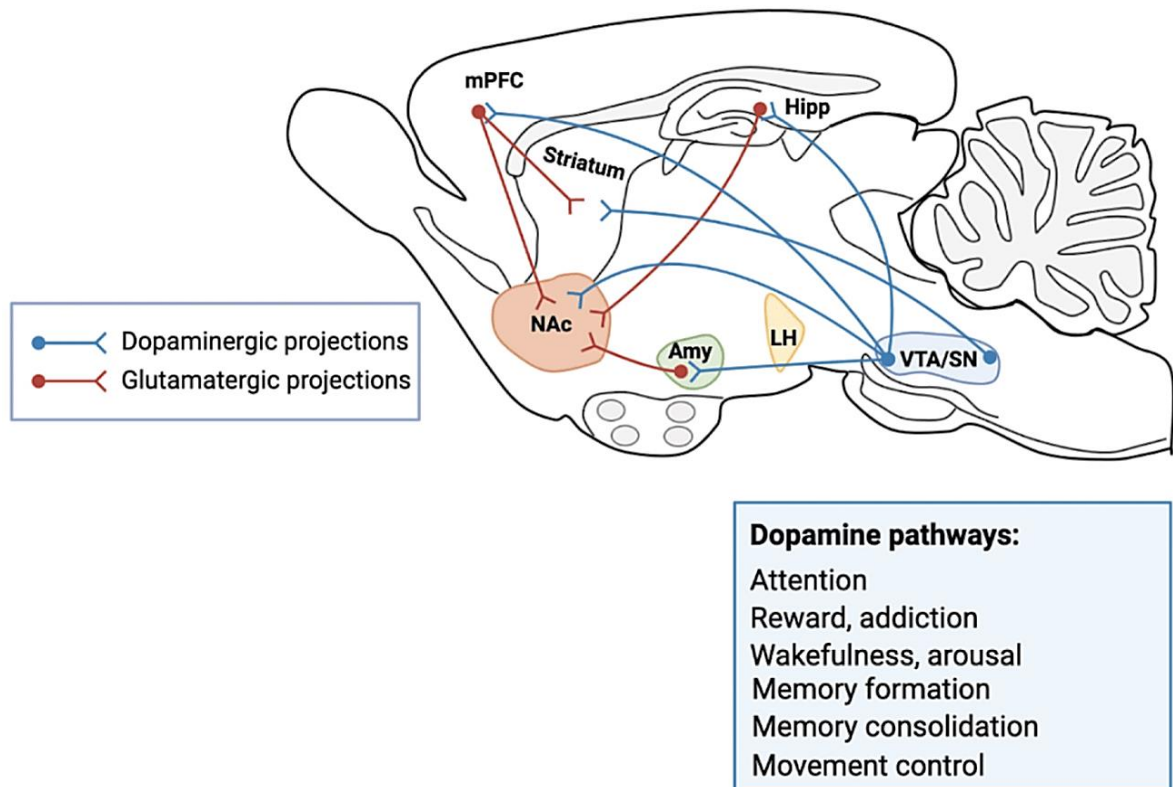
Existem vários motivos que podem contribuir em parte pela associação do TDAH com o TUS (SZOBOT *et al.*, 2007). Do ponto de vista fisiopatológico, o uso de substâncias pode promover a redução dos sintomas de TDAH através da liberação de neurotransmissores como a DA, semelhante ao que ocorre com medicamentos utilizados durante o tratamento (HOFFMEISTER *et al.*, 2013). Em relação ao comportamento, outros fatores também parecem estar envolvidos, como impulsividade e sintomas de transtorno de conduta. Isso ocorre porque a falta de controle comportamental pode levar ao aumento da tomada de riscos em busca de novidades e recompensas imediatas (GIGLIOTTI; GUIMARÃES, 2017). Morfologicamente, ambos os distúrbios envolvem áreas comuns como córtex frontal, sistema límbico e núcleos da base, incluindo o NAc e a via mesocorticolímbica (BARDO, 1998; IKEMOTO, 2010; SONUGA-BARKE, 2005). Além disso, pode existir uma susceptibilidade genética comum, uma vez que ambos demonstram perturbação nas vias de sinalização dopaminérgica, incluindo os genes DAT, DRD1 e DRD4 (AL-ETAIN *et al.*, 2012; BOBB *et al.* 2005; COMINGS *et al.*, 1997; GUINDALINI *et al.*, 2006; MARIGGIÒ *et al.*, 2021; SHAO *et al.*, 2006; TODD *et al.*, 2005). Dessa forma, o maior desafio é integrar estas descobertas, identificar a natureza destas vulnerabilidades e vincular a genética e a fisiologia aos modelos comportamentais e

processos cognitivos dos indivíduos que abandonam o uso recreativo e iniciam o uso compulsivo (ZANELATTO; LARANJEIRA, 2018).

1.2.2.4 Sistema dopaminérgico e via de recompensa

Existem três vias neurais dopaminérgicas principais de origem mesencefálica (Figura 1): a via nigroestriatal que consiste em projeções da substância negra para o corpo estriado dorsal; a via mesocortical que consiste em projeções da VTA para o córtex cerebral; e a via mesolímbica que consiste em projeções da VTA para o NAc no estriado ventral (MECK; 2006). Muitas evidências acumuladas obtidas através estudos clínicos e pré-clínicos apontam que a via mesolímbica é a mediadora-chave para os processos de motivação e na determinação das propriedades recompensadoras a um estímulo, incluindo drogas psicoestimulantes (BAIK, 2013; ROBBINS *et al.*, 1990; VOLKOW; MORALES, 2015). De maneira sucinta, quando neurônios dopaminérgicos, cujos corpos neuronais estão localizados na VTA, são estimulados, ocorre a liberação de DA em terminações axonais que se projetam ao NAc (PRUS; JAMES; ROSECRANS, 2011). O NAc, por sua vez contém neurônios espinhosos médios com receptores dopaminérgicos, que mediam e promovem a sensação hedônica e/ou motivação como mecanismo de recompensa, que pode ser natural para estímulos como a alimentação, ou não naturais como é o caso das drogas de abuso (BAIK; 2013). Em múltiplos comportamentos, o papel da DA no NAc sinaliza previsões e expectativas sobre estímulos motivacionalmente salientes para o suposto propósito de guiar a ação. Esse mecanismo leva em consideração a valência do reforçador, o tipo de ação ou aprendizado que está sendo realizado e as decisões que estão sendo tomadas para adquirir esses resultados (SADDORIS *et al.*, 2013). Esta ativação fortalece o comportamento de recompensa e, em última análise, promove a busca por estímulos hedônicos (BAIK, 2013; PRUS, JAMES, ROSECRANS, 2011; VOLKOW; MORALES, 2015).

Figura 1 – Vias encefálicas envolvendo o VTA e a substância negra de roedores



Fonte: SPERANZA *et al.*, 2021.

A VTA é uma região que contém neurônios dopaminérgicos, GABAérgicos, glutamatérgicos e outros subtipos neuronais. Embora heterogêneos, os neurônios dopaminérgicos são o subtipo neuronal predominante, representando 60-65% de todos os neurônios VTA em modelos de roedores (NAIR-ROBERTS *et al.*, 2008). Historicamente, esses neurônios dopaminérgicos foram classificados de acordo com sua expressão de tirosina hidroxilase (TH), a enzima limitante na cascata de biossíntese de DA. Durante a síntese de DA, a TH converte a tirosina em L-DOPA, que é então descarboxilada para se tornar DA (DAUBNER; LE; WANG, 2011; SPERANZA *et al.*, 2021). Geralmente, os neurônios dopaminérgicos na VTA também expressam o(a): transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2), que é responsável por empacotar a DA novamente para as vesículas sinápticas; e o DAT, que recapta a DA presente na fenda sináptica (BECKER-KRAIL; WALKER; NELSON, 2022; SPERANZA *et al.*, 2021). Outra característica comum dos neurônios dopaminérgicos na VTA são seus distintos padrões de disparo eletrofisiológicos, podendo ser: um padrão tônico que libera DA de maneira frequente e em quantidade basal; ou um padrão fásico que libera a DA de maneira mais rápida e em maior quantidade após um estímulo aferente (GRACE; ONN, 1989; VOLKOW; MORALES, 2015;). Acredita-

se que a atividade de disparo do padrão fásico desses neurônios seja um componente importante do circuito de recompensa (SCHULTZ, 2007).

Por sua vez, o NAc é quase inteiramente de neurônios espinhosos médios (GANGAROSSA *et al.*, 2013). Essa população neuronal é dividida em dois subtipos funcionais com base em sua expressão relativa de receptores de DA tipo 1 ou 2, os quais, respectivamente, estimulam e inibem a adenilato ciclase na conversão de trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O AMPc desencadeia uma cascata que promove a expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica (BECKER-KRAIL; WALKER; NELSON, 2022; SPERANZA *et al.*, 2021). Ou seja, quando a DA é liberada pelos neurônios dopaminérgicos pré-sinápticos que contém o corpo celular no VTA, ela se liga aos seus receptores (DRD1 e DRD2) na superfície celular dos neurônios pós-sinápticos dos neurônios espinhosos médios no NAc, que, por sua vez, ativa cascatas de sinalização de segundo mensageiro, levando a alterações na transcrição do RNA e na tradução de novas proteínas (BENDERSKY *et al.*, 2021).

Na verdade, existem cinco subtipos específicos de receptores de DA (DRD1 a DRD5, sendo todos acoplados à proteína G), mas funcionalmente cada receptor é geralmente classificado em do tipo DRD1 (D1 e D5) ou do tipo DRD2 (D2, D3 e D4). Entretanto, a expressão dos receptores D3, D4 e D5 no cérebro é significativamente mais restrita e fraca do que a dos receptores D1 ou D2 (BAIK, 2013; VOLKOW; MORALES, 2015). Uma diferença apontada entre os receptores do tipo DRD1 e do tipo DRD2 é a sua afinidade pela DA, com o receptor DRD2 apresentando uma afinidade 10 a 100 vezes maior do que o DRD1 (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). Com base na afinidade, acredita-se que o DRD1 seja preferencialmente ativado pelo disparo fásico de neurônios dopaminérgicos, ou seja, por elevadas concentrações transitórias de DA mediadas por um estímulo, enquanto o DRD2 seria ativado em nível basal durante os padrões tônicos (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; GOTO; OTANI; GRACE., 2007). No entanto, como há aleatoriedade nos disparos e a maioria destes estudos é realizada *in vitro*, não está claro se esta diferença na afinidade se reflete nas cascatas de sinalização à jusante, sendo difícil inferir se os DRD2 são preferencialmente ativados pelos níveis extracelulares basais de DA *in vivo* (GRACE *et al.*, 1989).

Em relação às projeções dos neurônios espinhosos médios do NAc há diferença notável entre os DRD1 e os DRD2. O NAc envia projeções de volta a VTA

por meio de duas vias. Uma é a via direta que se projeta para a VTA e/ou para a substância negra do mesencéfalo ventral. A outra é a via indireta que se faz relação primeiro com o globo pálido antes de se conectar ao VTA no mesencéfalo ventral. Acredita-se que a via direta seja composta principalmente por neurônios espinhosos médios contendo DRD1 e seja promotora de recompensa, enquanto a via indireta seja composta de DRD2 e promova a inibição à aversão (HIKIDA *et al.*, 2010; MACPHERSON *et al.*, 2014). Assim, para serem reforçadores, os aumentos de DA induzidos por drogas precisam ser rápidos e suficientemente grandes para estimular DRD1 e DRD2, levando à ativação da via direta e à inibição da via indireta. A estimulação DRD1 no NAc por si só é suficiente para produzir recompensa medicamentosa, enquanto a estimulação DRD2 não é, e a recompensa máxima ocorre quando tanto DRD1 quanto DRD2 são ativados (VOLKOW; MORALES, 2015). No entanto, é importante notar evidências recentes que sugerem que essa classificação pode estar simplificando demais e ignorando nuances do sistema como o tempo de estimulação (KUPCHIK *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018). Finalmente, o NAc constitui a maior parte do estriado ventral e também pode ser subdividido anatomicamente em um núcleo central (*core*) e um periférico ou casca (*shell*). Embora bastante controverso, ao núcleo central é atribuída a responsabilidade pela valoração de uma ação enquanto que ao núcleo periférico é responsável pela valoração de uma recompensa (SADDORIS *et al.*, 2013). Embora o NAc integre informações de todas as estruturas corticais e límbicas para mediar a motivação e o comportamento direcionado a objetivos, as vias entre a VTA e o NAc são consideradas canônicas para o processamento de recompensa, valor hedônico e motivação (BAIK, 2013; BECKER-KRAIL; WALKER; NELSON, 2022).

Com base em inúmeras descobertas científicas, as substâncias de abuso e recompensas naturais atuam diretamente nas vias mesolímbicas para aumentar a liberação de DA mediada pela VTA no NAc, promovendo sensações hedônicas e subsequente comportamento de busca de recompensa (SPERANZA *et al.*, 2021). Estudos clínicos e pré-clínicos mostraram que quase todas as substâncias de abuso, incluindo cocaína, anfetamina, álcool, nicotina e outras produzem um aumento da atividade dopaminérgica no NAc (BECKER-KRAIL; WALKER; NELSON, 2022; VOLKOW; MORALES, 2015). Em particular, acredita-se que as drogas de abuso aumentam significativamente o disparo dopaminérgico fásico na VTA, resultando em liberação suprafisiológica rápida, intensa e sustentada de DA no NAc, ativando a via

direta por meio do estímulo dos DRD1 e concomitantemente inibindo a via indireta ao atuarem sobre os DRD2 (BAIK, 2013; VOLKOW; MORALES, 2015). Além de aumentar os níveis de DA, a exposição repetida a drogas também demonstrou a sub-regulação (*downregulation*) na expressão e/ou ligação de DRD2 (VOLKOW *et al.*, 2001; 2009; VOLKOW; MORALES, 2015). Além disso, são induzidas alterações em longo prazo na neuroplasticidade, aumentando a sensibilidade do NAc a substâncias de abuso e promovendo comportamentos motivados e de busca por recompensa (BECKER-KRAIL; WALKER; NELSON, 2022; VOLKOW; MORALES, 2015).

1.2.3 Medicamentos

1.2.3.1 TDAH e os medicamentos psicoestimulantes

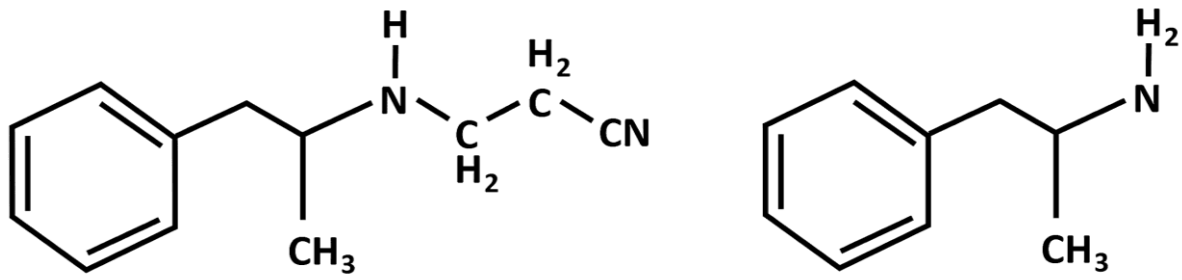
Pacientes com TDAH necessitam de um plano de tratamento abrangente e holístico que atenda às necessidades psicológicas, comportamentais e educacionais. De acordo com as diretrizes clínicas internacionais, a primeira linha de tratamento para crianças menores de 5 anos é o treinamento parental na gestão do comportamento e na realização de intervenções comportamentais na sala de aula. Para crianças com idade superior aos 6 anos recomenda-se o tratamento medicamentoso em combinação com tratamento psicossocial (DALRYMPLE *et al.*, 2020; SUGAYA *et al.*, 2022). O tratamento medicamentoso clássico de indivíduos que apresentam o TDAH é o tratamento com estimulantes como anfetaminas e metilfenidato. As quais, geralmente, aumentam os níveis de neurotransmissores monoaminérgicos, como a DA e NA, em diferentes vias encefálicas corticais e subcorticais (MINZENBERG, 2012; SINGH, 2008). Atualmente, o medicamento de primeira linha utilizado para tratar crianças com TDAH é o metilfenidato (LEONARD *et al.*, 2004). A sua utilização começou por volta de 1960 e, ao longo das últimas décadas, numerosos estudos em adultos com TDAH demonstraram uma elevada eficácia terapêutica, uma vez que setenta por cento dos pacientes normalmente apresentam melhora no seu quadro clínico (GENRO *et al.*, 2010; RETZ; RETZ-JUNGINGER, 2014). No entanto, sabe-se que o metilfenidato bloqueia o DAT e o transportador de noradrenalina (NET), impedindo a recaptção de DA e NA na fenda sináptica, semelhante a psicoestimulantes como anfetaminas e cocaína (LEONARD *et al.*, 2004).

Como medicamentos de segunda linha são indicados os medicamentos derivados da anfetamina: lisdexanfetamina e dexanfetamina (DALRYMPLE *et al.*, 2020). Anfetaminas além de bloquear DAT e o NET, entram nas células por difusão, inibindo assim a enzima monoamina oxidase (MAO), que está envolvida na degradação de neurotransmissores monoaminérgicos. A inibição da MAO leva a um aumento na concentração de catecolaminas no neurônio que, indiretamente, gera aumento da liberação de DA e NA (MINZENBERG, 2012; RETZ; RETZ-JUNGINGER, 2014). Estas propriedades farmacológicas podem aumentar a probabilidade de que as pessoas tratadas com este medicamento venham a desenvolver TUS (BERMAN *et al.*, 2018). Também foram relatados efeitos colaterais típicos relacionados ao sistema cardiovascular e à hipertensão, especialmente nas fases iniciais do tratamento (CLAVENNA; BONATI, 2014; PREDIGER *et al.*, 2018; RABINER, 2013). Estes dados destacam a necessidade de cautela no tratamento de crianças com TDAH com medicamentos psicoestimulantes (COSTA *et al.*, 2021).

1.2.3.2 Fenproporex (FEN)

O FEN ou femproporex (N-2-cianoetilanfetamina) pertence a um grupo de substâncias denominadas estimulantes do tipo anfetamina. Foi sintetizado pela primeira vez num laboratório francês em 1965, modificando a estrutura química da anfetamina (BARONEZA *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2013). Possui massa molar de 224,735 g.mol⁻¹ e fórmula molecular C₁₂H₁₆N₂.HCL (Figura 2). Sabe-se atualmente que o FEN atua como uma pró-droga, pois é em grande parte metabolizado para anfetamina (33,0% a 66,0%) (PAUMGARTTEN; PEREIRA; DE OLIVEIRA, 2016). As anfetaminas, por sua vez, atuam liberando catecolaminas (isto é, DA e NA) e inibindo sua recaptção nas terminações nervosas, que têm efeitos profundos no SNC e sobre o comportamento (CODY *et al.*, 1999; MARIOTTI *et al.*, 2013;).

Figura 2 - Geometria molecular do fenproporex e anfetamina



Fonte: O autor. Estrutura química do fenproporex (N-2-cianoetilanfetamina) e da anfetamina.

O Brasil foi um dos maiores consumidores deste fármaco (MOREIRA *et al.*, 2005; PAUMGARTTEN; PEREIRA; OLIVEIRA, 2016). Devido às suas propriedades farmacológicas o FEN era prescrito e utilizado como anoréxico sob o nome comercial Desobesi-M®. Em 2011, após amplas discussões com a população, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) cancelou o registro dos seguintes medicamentos: FEN, Mazindol, Anfepramona e Sibutramina através da RDC nº 52/2011. Porém, com o apoio do Conselho Federal de Medicina, o Congresso Nacional ultrapassou a competência regulatória da Anvisa e autorizou a produção, comercialização e o uso por meio da promulgação da lei nº 13.454/2017. Recentemente, em outubro de 2021, o Supremo Tribunal Federal declarou inconstitucional a lei nº 13.454/2017 sob o argumento de que cabe à ANVISA tomar uma decisão sobre esta questão (PAUMGARTTEN, 2022). A decisão da ANVISA pautou-se na observação genérica de que medicamentos do tipo anfetamina podem gerar graves riscos cardiopulmonares e para o SNC (ANVISA, 2012), uma vez que a literatura carece de estudos experimentais e clínicos sobre o potencial desenvolvimento de vício pelo uso de FEN. Tal decisão impacta o cenário nacional, já que o Brasil tem sido dos maiores consumidores mundiais de FEN nas últimas décadas, e os estimulantes do tipo anfetamina são a terceira droga mais utilizada por estudantes universitários do sexo feminino no país (BELL *et al.*; 2001; BRASIL, 2010; COMIRAN *et al.*, 2012; MARIOTTI *et al.*, 2013; PAUMGARTTEN *et al.*, 2016, REZIN *et al.*, 2011). Segundo Gigliotti e Guimarães (2017), essa peculiaridade relacionada ao sexo se deve ao fato de as meninas darem mais importância à imagem corporal e ao peso, sendo, portanto, o uso de estimulantes do tipo anfetamina uma estratégia para alcançar a imagem corporal desejada. Deve ser também observado que o

consumo de drogas pelo sexo feminino tem crescido rapidamente nas últimas décadas (TUCHMAN, 2014).

A perda de peso tem sido atribuída a supressão do centro de controle do apetite no hipotálamo lateral após a liberação de catecolaminas (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Em um estudo não randomizado com pacientes obesos sem comorbidades (85,5% do sexo feminino) que seguiram dieta hipocalórica por 2 meses, foi constatada uma perda de peso média de 5,43 kg nos pacientes tratados diariamente com 33,6 mg de FEN contra 3,88 kg nos pacientes tratados com placebo. É digno de nota que aproximadamente um terço dos participantes não concluiu o estudo, e o grupo de tratamento com FEN apresentou efeitos colaterais como ansiedade, insônia, irritabilidade e boca seca (ATTIÉ-JUNIOR; MEDEIROS-NETO, 1972).

Um ensaio randomizado realizado com 174 mulheres obesas de idade entre 18 e 50 anos foi desenvolvido com o objetivo de comparar a eficácia sobre a perda de peso e a segurança de cinco medicamentos anoréxicos durante um período de tratamento de 52 semanas. Ao mesmo tempo, a atividade física e a dieta alimentar foram incentivadas para promover a perda de peso. Os pacientes tratados com 25 mg de FEN alcançaram uma perda de peso média de 7,8 kg, enquanto o grupo placebo alcançou uma perda de peso de 3,1 kg. Os seguintes efeitos colaterais foram observados: ansiedade, insônia, irritabilidade, boca seca e constipação (SUPLICY *et al.*, 2014).

Embora esse efeito anorexígeno possa ser entendido como um benefício ao indivíduo, uma de suas consequências é que, uma vez finalizado o efeito estimulante, o usuário fica exposto aos efeitos negativos com a indução de depressão, fadiga e sono (TAKITANE *et al.*, 2013). Teoricamente, o uso do FEN pode causar sensibilização comportamental, a qual é caracterizada pelo aumento gradual dos efeitos em decorrência da administração prolongada dessa substância. Quando tal fenômeno ocorre, desenvolve-se uma série de adaptações neuroquímicas e moleculares persistentes do sistema dopaminérgico, que podem estabelecer o desenvolvimento de TUS (PARO *et al.*, 2008). De acordo com Paumgarten, Pereira e de Oliveira (2016) o uso de FEN no tratamento da obesidade carece de ensaios clínicos adequadamente conduzidos, randomizados e controlados, pois é surpreendente que, apesar da falta de evidências empíricas de boa qualidade que suportem seu uso, o FEN tenha sido utilizado na América Latina e em alguns países europeus por mais de três décadas.

Em estudos experimentais demonstrou-se que a administração (i.p.) de FEN em ratos resulta em altas concentrações de anfetaminas no cérebro após 5min, cujo pico é alcançado após 15min (COUTTS *et al.*, 1986). Além disso, foi demonstrado que o FEN (i.p.) em ratos jovens e adultos jovens altera a atividade da acetilcolinesterase (TEODORAK *et al.*, 2015) e da Na⁺, K-ATPase⁺ (REZIN *et al.* 2014), bem como o metabolismo energético no SNC (REZIN *et al.*, 2011). No entanto, resta saber se a exposição repetida ao FEN pode atuar no circuito de recompensa encefálico (via mesolímbica) de modo a promover o desenvolvimento de comportamentos hedônicos (prazerosos), de busca, agitação psicomotora e sensibilização comportamental (TSUANG *et al.*, 1996; ROBINSON; BERRIDGE, 2001; AGRAWAL; LYNSKEY, 2008).

1.2.4 Modelos experimentais: Ratos de laboratório

1.2.4.1 Ratos de laboratório na pesquisa de transtornos psiquiátricos

Os modelos animais são essenciais à pesquisa biomédica por causa da possibilidade de controlar o ambiente onde vivem, pela disponibilidade de sistemas nervosos mais simples e a possibilidade de realizar intervenções (SAGVOLDEN *et al.*, 2009). Como modelos experimentais, os ratos, apresentam uma série de vantagens em favor de sua utilização, tais como: fácil manuseio e transporte, dieta semelhante à humana, elevada taxa de sucesso reprodutivo, similaridades com os humanos na organização e funcionamento dos sistemas orgânicos e comportamentos mais fáceis de interpretar do que os casos clínicos humanos (AITMAN *et al.*, 2008; JACOB, 1999; RAMOS *et al.*, 2023; RICHTER, 1954; SAGVOLDEN *et al.*, 2005; TECOTT, 2003).

Devido a uma ancestralidade comum entre humanos e ratos sugere-se uma grande similaridade genética entre as espécies, uma vez que 95% dos genes de roedores são compartilhados com seres humanos (BRYDA, 2013; MADSEN *et al.*, 2001; MURPHY *et al.*, 2001). Assim, a utilização do rato de laboratório (*Rattus norvegicus*) como modelo de estudo tem ganhado espaço entre os geneticistas ao possibilitar a comparação de regiões cromossômicas do rato com as de humanos através de bancos de dados genômicos (PARKER *et al.*, 2014). Essa estratégia experimental tem contribuído na compreensão do papel do genoma durante o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos complexos (RAMOS *et al.*, 2023).

Quase todos os genes humanos conhecidos por estarem associados a uma patologia possuem ortólogos no genoma de ratos (GIBBS *et al.*, 2004) e a maioria dos genes causadores de patologias identificadas em ratos também demonstrou desempenhar um papel fisiopatológico em humanos (AITMAN *et al.*, 2008). Nesse ínterim, numerosos estudos com linhagens isogênicas (consanguíneas) de ratos demonstraram ser uma ferramenta interessante no estudo de doenças mentais humanas. Tal fato deve-se à proximidade genética dos indivíduos da mesma linhagem, bem como ao controle da variabilidade ambiental em laboratório (RAMOS *et al.*, 2023; PARKER *et al.*, 2014; PREDIGER *et al.*, 2018).

Apesar dos transtornos mentais serem patologias essencialmente humanas, algumas linhagens de ratos têm servido de modelo para alguns transtornos quando conseguem mimetizar sintomas e/ou comportamentos (validade aparente), reproduzir mecanismos neurobiológicos (validade de constructo) e responder similarmente à ação de drogas utilizadas para o tratamento da patologia (validade preditiva) (CHADMAN; YANG; CRAWLEY, 2009; SAGVOLDEN *et al.*, 2009). Sendo que algumas respostas fisiopatológicas parecem ser conservadas evolutivamente e parte de um mecanismo universal através do qual os organismos se adaptam às condições adversas impostas pelo ambiente (GROSS; HEN, 2004).

1.2.4.2 Linhagem SHR como modelo de TDAH

A linhagem SHR (do inglês, *Spontaneously Hypertensive Rats*) consiste em ratos, que desenvolvem hipertensão arterial espontaneamente, e que foram geneticamente selecionados na década de 1960, a partir de uma linhagem de ratos Wistar (OKAMOTO; AOKI, 1963; OKAMOTO *et al.*, 1966). Esses animais apresentam características especiais no estudo do TDAH, uma vez que demonstram validade aparente quando comparados a sua linhagem controle Wistar Kyoto (WKY). Dentre eles pode-se citar, déficit de atenção, de aprendizado e de memória, hiperatividade e impulsividade, que se desenvolve ao longo do tempo quando há poucos reforçadores (SAGVOLDEN *et al.*, 2009; PAMPLONA *et al.*, 2009; PANDOLFO *et al.*, 2013).

Quando se trata de validade preditiva, pesquisadores já testaram o tratamento de animais SHR com metilfenidato, o que resultou numa redução de comportamentos relacionados ao TDAH na idade adulta. (WULTZ *et al.*, 1990; ASPIDE *et al.*, 2000; DE BRUIN *et al.*, 2003; ADRIANI; LAVIOLA, 2004; JENTSCH, 2005). Similar ao que

eventualmente ocorre durante o tratamento do TDAH, em algumas abordagens não houve sucesso e resultaram no aumento da hiperatividade e do uso de drogas na idade adulta (AUGUSTYNIAK *et al.*, 2006; CLAVENNA; BONATI, 2014; HARVEY *et al.*, 2011; RABINER, 2013; VENDRUSCOLO; IZÍDIO; TAKAHASHI, 2008, 2009). A linhagem SHR também se mostrou promissora em estudos sobre abuso de substâncias, uma característica que se acredita ser comórbida com o TDAH (VENDRUSCOLO; IZÍDIO; TAKAHASHI, 2008, 2009).

Em relação à validade de constructo, um estudo mostrou que os ratos SHR tinham uma inserção de 160 pares de bases (Pb), na região não codificante do gene do DAT, o que diminui a captação de DA na fenda sináptica e, conseqüentemente, contribui para a atividade mediada por essa catecolamina (MILL *et al.*, 2005). Porém, em geral, estudos bioquímicos sugerem uma função hipodopaminérgica nos ratos SHR, uma vez que os telodendros dos neurônios dopaminérgicos mesocorticais, mesolímbicos e nigroestriatais de SHR liberam menos DA em resposta à estimulação elétrica e/ou despolarização como resultado da exposição a altas concentrações extracelulares de K do que os controles WKY (REGAN; WILLIAMS; VORHEES, 2022; RUSSEL 2002). Ainda foi observado que a expressão de TH está diminuída no estriado dorsal e NAc (FULLER *et al.*, 1983). Houve uma diminuição nas concentrações basais de DA extracelular no núcleo caudado e NAc em comparação aos animais controles (DE JONG *et al.*, 1995; FUJITA *et al.*, 2003; LINTHORST *et al.*, 1991). Alguns estudos utilizando microdiálise e preparações de cortes encefálicos sugerem que a diminuição da liberação de DA em comparação com ratos controle pode estar relacionada ao aumento da inibição mediada por DRD2 (LINTHORST *et al.*, 1991; RUSSELL, 2000; 1991; VAN DEN BUUSE *et al.*, 1991). Além disso, vários estudos mostraram suprarregulação (*upregulation*) da expressão de DRD1 e DRD2 no NAc, estriado e córtex frontal (CHIU *et al.*, 1982; CHIU *et al.*, 1984; LIM *et al.*, 1989; PAPA *et al.*, 2002; SADILE, 2000), o que é consistente com a diminuição da liberação de DA (REGAN; WILLIAMS; VORHEES, 2022).

Uma regulação da via mesocorticolímbica parece ocorrer durante o desenvolvimento e induz alterações bioquímicas duradouras na linhagem SHR. Foi demonstrado que em SHR existe uma grande quantidade de DA extracelular presente durante o período pré-desmame, que mais tarde se manifesta como hipofunção dopaminérgica (RUSSELL, 2000). Nesse sentido, a baixa função do DAT relatada em alguns estudos no início do desenvolvimento pode promover mecanismos

compensatórios em DRD2. Além disso, observou-se que a redução subsequente de DA induzida por estímulo aumentou os níveis de DRD1 no NAc de SHR, o que é consistente com o papel da DA no TDAH (CAREY *et al.*, 1998). A linhagem SHR também é conhecida por apresentar maior aumento nos níveis de outras catecolaminas, como adrenalina e NA, em situações estressantes, em comparação com algumas outras linhagens (HENDLEY; OHLSSON, 1991; KIRBY, 1989); e alterações glutamatérgicas e dopaminérgicas associadas à memória associativa e à recompensa (HEAL *et al.*, 2008; WELLS *et al.*, 2010). Todos estes estudos fazem dos ratos SHR uma das linhagens mais utilizadas na investigação do TDAH. No entanto, ainda existem algumas controvérsias e limitações no uso desta linhagem como modelo para pesquisas sobre TDAH, como a coexistência de hipertensão arterial (FERGUSON; CADA, 2003; PREDIGER *et al.*, 2018; REGAN; WILLIAMS; VORHEES, 2022).

1.2.4.3 Linhagem SLA16 e a região genômica *Anxrr16*

Um fenômeno bastante comum na pesquisa comportamental em animais de laboratório é que diferentes linhagens de ratos apresentam diferentes respostas comportamentais aos mesmos estímulos estressores. Por exemplo, ratos LEW e SHR apresentam perfis contrastantes em seus níveis de locomoção no centro do campo aberto (CA), com ratos LEW explorando menos essa área considerada aversiva, enquanto ratos SHR apresentam níveis mais elevados. Um estudo utilizando gerações provenientes do inter cruzamento de ratos LEW e SHR mostrou que o contraste fenotípico foi condicionado pelos genótipos dos animais, sendo que um *locus* gênico (*Anxrr16*), localizado no Chr4, possui a maior pontuação para esse traço quantitativo (QTL) (RAMOS *et al.*, 1997, 1999, 2023).

Para investigar como genes, produtos gênicos e mecanismos subjacentes no *locus Anxrr16* influenciam o comportamento relacionado à locomoção no centro do CA, foi desenvolvida uma linhagem congênica no LGC/UFSC. Os animais das linhagens LEW e SHR foram inter cruzados e, após a genotipagem, os ratos híbridos foram continuamente retro cruzados com a linhagem parental SHR. Após 10 gerações de retro cruzamento, houve a transferência de uma RGD (a qual contém o *locus Anxrr16*) da linhagem doadora LEW para o fundo genético (*background*) da linhagem receptora SHR (DE MEDEIROS *et al.*, 2014). Logo após, os animais foram cruzados

entre si durante 20 gerações para criar uma linhagem chamada SHR.LEW-(D4Rat76–D4Mgh11) ou simplesmente SLA16 (DE MEDEIROS *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2023).

A RGD contendo o *locus Anxrr16* tem cerca de 81,9 mega pares de bases (Mpb), localizada entre os marcadores moleculares D4Rat76 e D4Mgh11 no Chr4 do rato, em 85,2 e 167,1Mpb, respectivamente (SMITH *et al.*, 2020). Na linhagem congênica SLA16, além da região contendo apenas alelos LEW, duas regiões flangeadoras abrigam alelos de ambas as linhagens parentais. Essas zonas de transição (sempre esperadas) encontram-se entre 78,0 - 85,2 Mpb e 167,1 - 181,4 Mpb (DE MEDEIROS *et al.*, 2014). A criação de uma linhagem congênica como a SLA16 permite, juntamente com a SHR, a investigação de um RGD alvo sem a interferência do restante do genoma (diferentemente das populações F2). Também é importante enfatizar que a estratégia de QTL envolvida na avaliação do *locus* e na construção da linhagem é baseada na variação genética natural, diferentemente das abordagens *knockout* ou transgênicas (RAMOS *et al.*, 2023).

Essa RGD contém numerosos genes de interesse envolvidos em respostas emocionais, estresse, imunidade, consumo de etanol e vias de sinalização gabaérgica, dopaminérgica e glutamatérgica (RAMOS *et al.*, 2023; SPENCE *et al.*, 2018). Contudo, é importante notar que esta região contém não apenas genes, mas também variantes genômicas não codificantes que podem desempenhar um papel fundamental nos efeitos observados da RGD (ALSAMY; BLANGERO, 2009). Além disso, diferentes variantes ligadas (ou seja, genes ou regiões regulatórias localizadas na mesma região cromossômica) podem ser responsáveis pelas características fenotípicas apresentadas (IZIDIO *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2023).

Como ambas as linhagens, SHR e SLA16, são criadas sob os mesmos padrões rígidos de controle ambiental, o comportamento distinto entre elas pode ser atribuído à RGD no Chr4. Portanto, após o desenvolvimento da linhagem SLA16, inúmeros testes comportamentais para avaliar a locomoção, memória, aprendizagem e emocionalidade foram realizados em comparação à linhagem SHR (RAMOS *et al.* 2023). Sendo que a linhagem SLA16 apresentou maior reatividade motora ao longo da vida (ANSELMINI *et al.*, 2016; DE MEDEIROS *et al.*, 2014; GRANZOTTO, 2022; PÉRTILE *et al.*, 2017), maior prejuízo de aprendizagem (ANSELMINI *et al.*, 2016; VELÁZQUEZ *et al.*, 2019) e maior tomada de risco em áreas aversivas de aparatos, o que pode ser tomado como uma diminuição da emocionalidade e/ou aumento do

comportamento de impulsividade (RAMOS *et al.*, 2023). Adicionalmente Granzotto (2016) observou que as linhagens SHR e SLA16, mesmo durante exposição repetidas (5 dias seguidos), mantiveram índices locomotores elevados no teste do CA de 5 e 60 min, ou seja, sem habituação locomotora. Observou-se ainda que o perfil comportamental dos animais SHR e SLA16 possui particularidades ligadas ao sexo, uma vez que fêmeas manifestaram valores de locomoção no CA maiores que o dos machos. Por exemplo, no período pós-desmame, a média da distância total percorrida pelas fêmeas em 5 min no CA foi de 30 metros, contra 17 metros pelos machos (GRANZOTTO, 2022). Esse perfil comportamental demonstra-se basal e independente da influência dos hormônios sexuais, uma vez que ratas SHR e SLA16 não diferiram nos parâmetros locomotores e de exploração do CA, labirinto em cruz elevado (LCE) e caixa branco e preta durante as diferentes fases do ciclo estral (DE MEDEIROS *et al.*, 2014; TANIGUCHI, 2013).

1.2.4.4 Modelos experimentais no estudo do TUS

Para estudar experimentalmente o potencial desenvolvimento de TUS tem-se utilizado modelos/paradigmas de testes clássicos associados ao contexto: o procedimento operante de autoadministração e o procedimento clássico de PLC (EVERITT; ROBBINS, 2005; NEIL *et al.*, 1986; ROBBINS; EHRMAN, 1992; SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006). Sendo que, geralmente, esses testes são acompanhados pela avaliação do estado psicomotor durante o uso de substâncias (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006).

Os procedimentos de autocontrole operante são baseados no trabalho de Skinner (1937) e são caracterizados por condicionar respostas comportamentais com base nas consequências ou efeitos de estímulos reforçadores. No modelo clássico, os animais geralmente são introduzidos em uma caixa operante com duas barras. Durante o condicionamento, ao pressionar uma das barras por um número predeterminado de vezes facilita a liberação de uma dose da substância (por via intravenosa, intracerebral ou outro meio), enquanto que ao pressionar a segunda barra não gera qualquer estimulação. Em estudos utilizando drogas reconhecidas por seus efeitos de reforço positivo, observou-se um aumento no comportamento para aquisição da droga. Ou seja, os animais pressionaram com mais frequência as barras relacionadas às drogas (PANLILIO, 2011; PISANU *et al.*, 2015). Porém, este modelo

requer equipamentos mais sofisticados, por isso os testes de PLCs são os mais utilizados por serem economicamente acessíveis e possuírem protocolos simples.

O paradigma de PLC é um modelo comportamental pré-clínico amplamente usado para o estudo dos efeitos hedônicos/recompensa e aversivos de tratamentos farmacológicos, incluindo drogas de dependência (PRUS; JAMES; ROSECRANS, 2009; TZSCHENTKE, 2007). A PLC baseia-se no condicionamento clássico uma vez que os estímulos contextuais podem adquirir propriedades apetitivas secundárias (efeitos condicionados recompensadores) quando combinados com um reforço primário (por exemplo, uma droga de abuso) (TZSCHENTKE, 2007; MCKENDRICK; GRAZIANE, 2020). O condicionamento clássico (ou condicionamento pavloviano respondente) é demonstrado em muitos vertebrados, incluindo humanos (CARTONI; BALLEINE; BALDASSARRE, 2016).

Ainda que vários desenhos experimentais e modelos de dispositivos (por exemplo, Figuras 11 e 12) tenham sido usados no paradigma de PLC, as características básicas do condicionamento incluem a associação dos efeitos do tratamento de uma droga com um ambiente específico, seguida pela associação da ausência da droga com um ambiente diferente (TZSCHENTKE, 2007; MCKENDRICK; GRAZIANE, 2020). De acordo com uma revisão de Prus, James e Rosecrans (2009) um modelo de dispositivo comum da PLC consiste de três compartimentos: os compartimentos externos com características diferentes (por exemplo, cores/padrões de parede e textura do piso) e um compartimento central que não será pareado a uma droga ou veículo. As portas entre os comportamentos podem ser abertas, permitindo que o rato se movimente livremente entre os mesmos. Na fase de condicionamento, o rato recebe uma droga com propriedades potencialmente recompensadoras (ou aversivas) e é colocado por vários minutos em um dos compartimentos externos. Em outro momento (turno ou dia seguinte), o rato recebe o veículo da droga e é colocado no compartimento externo oposto. Geralmente, essas sessões diárias são alternadas por 2 a 3 dias até a realização de um teste. Na fase de teste o rato é colocado no compartimento central e as portas de ambos os compartimentos externos são abertas, sendo registrando o tempo que o rato permanece em cada compartimento externo. Quando o animal permanece significativamente mais tempo no compartimento pareado com droga tem-se uma PLC, o que pode ser visto em alguns tratamentos sistêmicos com drogas que atuam no sistema dopaminérgico, como a cocaína, anfetamina, mazindol, metilfenidato, entre outras (TZSCHENTKE, 2007).

Embora algumas dessas drogas tenham efeitos ligeiramente diferentes no SNC, a maioria delas produz PLC agindo nas vias mesolímbicas, ou seja, levando à liberação de DA da VTA em estruturas terminais como o NAc (PRUS, JAMES, ROSECRANS, 2009). Portanto, estudos também observaram que a administração de agonistas de DRD1 e DRD2 (como apomorfina, quinpirole e SKF82958) gera PLC (ABRAHAMS *et al.*, 1998; HALEEM *et al.*, 2005; KHROYAN *et al.*, 1999), enquanto antagonistas do DRD1 (como o SCH23390) e DRD2 (como haloperidol e metoclopramida) previnem o estabelecimento de PLC causado pela administração sistêmica de anfetaminas e cocaína (HOFFMAN; BENINGER, 1989; LINTHORST *et al.*, 1992; NAZARIUM *et al.*, 2004; MITHANI *et al.*, 1986; SPYRAKI; FIBIGER; PHILLIPS, 1982; SPYRAKI; NOMIKOS; VARONOS, 1987). A PLC induzida por anfetaminas também é abolida em camundongos DAT-KO (*knockout*), mas pode ser bloqueada pelo haloperidol (BARDO; BEVINS, 2000; MITHANI *et al.*, 1986; SPYRAKI; FIBIGER; PHILLIPS, 1982). Além disso, a injeção direta de psicoestimulantes na VTA ou no NAc também produz PLCs (BOZARTH, 1987; CARR; WHITE, 1983; GLIMCHER *et al.*, 1984; PHILLIPS; LEPIANE, 1980; PHILLIPS; LEPIANE; FIBIGER, 1983; VAN DER KOOY *et al.*, 1982; WHITE PACKARD; HIROI, 1991). Em ratos que desenvolveram PLC à cocaína, quando os mesmos foram colocados no compartimento condicionado com cocaína houve um aumento nos níveis de DA no NAc durante a administração de veículo, em oposição ao compartimento pareado com veículo (DUVAUCHELLE; IKEGAMI; CASTANEDA, 2000; DUVAUCHELLE *et al.*, 2000). De maneira complementar, estudos têm demonstrado que as propriedades recompensadoras da droga necessárias ao desenvolvimento da PLC não são dependentes da estimulação locomotora, do tempo de duração da fase teste do paradigma de PLC e do sexo dos animais (BARDO, ROWLETT; HARRIS, 1995; CARR; PHILLIPS; FIBIGER, 1988).

1.2.4.5 O uso de fêmeas no estudo de anorexígenos

A elevada busca de medicamentos anorexígenos, como o FEN, para além do tratamento da obesidade está associada a questões de ordem social e envolve, entre outros fatores, a estética e o modelo de feminilidade socialmente construído e esperado (MELO; OLIVEIRA, 2011). Para Cunha e colaboradores (2021) a insatisfação corporal e os padrões de aparência física e estilo de vida impostos pela

sociedade sobre a aparência da mulher são fatores determinantes para o elevado uso feminino de psicotrópicos anorexígenos. Por exemplo, em um estudo retrospectivo em 2003 para avaliar indicadores de dispensação e consumo de substâncias anorexígenas na cidade de Belo Horizonte - MG, quando analisada a distribuição do consumo de medicamentos por gênero, evidenciou-se a predominância absoluta de consumo pelas mulheres (88%), na proporção de 10:1 (CARNEIRO; GUERRA; ACURCIO, 2008). Em outro estudo que acompanhou 13 estabelecimentos farmacêuticos em Santa Maria no estado do Rio Grande do Sul no período de 2006 a 2007, a prescrição de anorexígenos era de 93,35% para indivíduos do sexo feminino (FELTRIN *et al.*, 2009). Já em Cascavel no Paraná, ao serem avaliadas 448 prescrições retidas em farmácias com manipulação em 2008, 393 (88%) correspondiam a usuários do sexo feminino (HENNIN; WIENS; SANCHES, 2011). Adicionalmente, em um estudo em cidades de São Paulo e em Brasília houve predomínio de pacientes do sexo feminino (92,7%), sendo que para os pesquisadores o uso de drogas do tipo anfetaminas no Brasil é particularmente prevalente entre as mulheres devido ao forte relacionamento à cultura da magreza como símbolo de beleza (NAPPO *et al.*, 2002).

Dessa forma, considerando a natureza feminina relacionado a esses dados epidemiológicos no uso de anorexígenos do tipo anfetamina faz-se necessário que pesquisas contemplem ratos fêmeas como modelo. O que foi por muito tempo negligenciado, pois até pouco tempo atrás havia um desequilíbrio no estudo de sexos em roedores e primatas para a fisiologia, farmacologia. Contudo o campo mais desigual era a neurociência, o qual incluía animais machos quase seis vezes mais do que as fêmeas (BEERY; ZUCKER, 2011). Acredita-se que esse desequilíbrio venha da crença de que o ciclo estral torna os dados de fêmeas mais variáveis do que os de machos, o que faz as pesquisas com fêmeas serem mais demoradas, de valor mais elevado e com maior número de animais utilizados. Entretanto, machos alojados em grupo, estabelecem uma hierarquia de dominância e apresentam níveis circulantes de testosterona cinco vezes maiores do que em subordinados, o que também promove elevada variabilidade de uma série de medidas fisiológicas, celulares, hormonais e comportamentais (MACHIDA; YONEZAWA; NOUMURA, 1981; BECKER; PRENDERGAST; LIANG, 2016; SHANSKY, 2019).

1.3 HIPÓTESES DO TRABALHO

1.3.1 Primeira hipótese

O tratamento repetido com FEN promove PLC. altera o comportamento emocional e modificação da expressão de TH, DRD1 e DRD2 no NAc, distintamente em ratas SHR e SLA16.

1.3.2 Segunda hipótese

O tratamento com uma única dose de FEN, após 15min ou $22\pm 1h$, altera o comportamento emocional, distintamente em ratas SHR e SLA16.

1.3.3 Terceira hipótese

O FEN altera atividade locomotora e medidas fisiológicas distintamente em fêmeas SHR e SLA16.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar os efeitos de FEN em ratas das linhagens SHR e SLA16. Para isso, foram avaliados os efeitos de FEN sobre os comportamentos de condicionamento por local e emocionais, atividade locomotora, medidas fisiológicas e expressão de DRD1, DRD2 e TH, no NAc, em ratas das linhagens SHR e SLA16.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se a administração repetida de FEN causa condicionamento por local em ratas das linhagens isogênicas SHR e SLA16.
- Avaliar o comportamento emocional em ratas das linhagens SHR e SLA16 após administração de FEN.
- Quantificar a TH, DRD1 e DRD2 no NAc de ratas das linhagens SHR e SLA16 após a administração de FEN.
- Examinar qual o efeito do FEN sobre a locomoção das ratas SHR e SLA16.
- Verificar se o FEN interfere no peso, defecação e consumo de água e ração das linhagens SHR e SLA16 durante a administração de FEN.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Fêmeas das linhagens SLA16 e SHR foram fornecidas pelo biotério do Laboratório de Genética do Comportamento do BEG/UFSC e acondicionadas em caixas de polipropileno opacas (41 x 34 x 18 cm; comprimento x largura x profundidade) com maravalha de pinus de qualidade laboratorial, em grupos de quatro. Elas foram mantidas sob condições controladas de temperatura ambiente ($22\pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação (12h claro/12h escuro, luzes acesas às 7h). Todos os animais eram ingênuos a qualquer procedimento experimental e foram testados entre 7 e 9 semanas de idade (SPEAR, 2000; SPEAR e BRAKE, 1983). Os procedimentos foram realizados após a aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal local (Protocolos UFSC/Brasil nº 9500240920). Além disso, observou-se o *The Rat Grimace Scale (NC3Rs)*, os princípios éticos em pesquisa animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), as orientações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSC (CEUA/UFSC) e a Lei Ordinária 11.794/2008 (DOU de 09/10/2008).

3.2 MEDICAMENTOS, DOSAGEM E ADMINISTRAÇÃO

O fármaco Fenproporex (FEN, Lepuge®) foi dissolvido em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e administrado na concentração de 4 mg por kg de peso corporal de animal. Essa dose foi definida através de um estudo piloto capaz de promover a PLC, onde utilizou-se as doses de 2, 4, 6 e 8 mg por kg de peso corporal de animal. Para o preparo individual do volume da dose (0,4 a 0,6 ml) de solução de FEN, anteriormente a cada administração, cada animal foi pesado na balança digital SF-400 (Electronic®). A distribuição dos animais em grupos que receberam a administração de solução de FEN ou de VEH (VEH; NaCl 0,9%) foi determinada de modo aleatório utilizando o programa Excel (Microsoft®). As administrações foram realizadas por via intraperitoneal (i.p.) respeitando os seguintes cuidados: a) contenção manual pelo dorso; b) posicionamento em decúbito dorsal com a cabeça inclinada ligeiramente para baixo, de modo a minimizar o risco de perfurações de vísceras uma vez que estas se deslocam em direção ao diafragma; c) assepsia com algodão embebido em

álcool a 70%; d) introdução de uma agulha estéril (22G) de forma angulada (entre 20° e 45°) com o quadrante inferior direito do abdome; e e) aspiração do conteúdo para verificar se alguma estrutura visceral oca foi atingida (bexiga urinária, intestino ou vaso sanguíneo). Quando houve mais de uma aplicação, os quadrantes abdominais inferiores foram alternados. As agulhas utilizadas não foram utilizadas mais do que 2 vezes, evitando maior atrito com ao inserir e retirar a agulha.

3.3 PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

3.3.1 Experimento 1: Teste de permanência de animais em estado livre de drogas (*naïve*) nos compartimentos do aparato de preferência por local condicionado (PLC)

Nesse experimento, um grupo *naïve* de fêmeas da linhagem SHR (n=8) e um da linhagem SLA16 (n=8), ou seja, que não receberam a administração de FEN ou VEH, foram testadas no aparato de preferência por local condicionado (PLC), de modo a verificar o percentual médio e o tempo de permanência nos compartimentos A e B (conforme será descrito no item 3.6.4) durante os 52, 55 e 58 dias de idade.

3.3.2 Experimento 2: Administração de repetidas doses de FEN

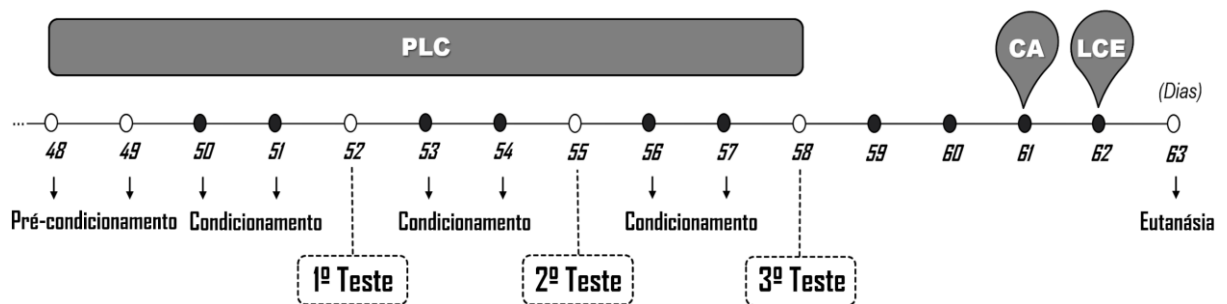
O experimento 2 (Figura 3) testou os animais na PLC entre os 48 e 58 dias (conforme será descrito no item 3.6.4); no campo aberto (CA) aos 61 dias (conforme será descrito no item 3.6.1), no labirinto em cruz elevado (LCE) aos 62 dias (conforme será descrito no item 3.6.2), bem como aos 63 dias os animais foram eutanasiados para coleta do NAc e posterior quantificação de DRD1, DRD2 e TH (conforme será descrito no item 3.7). Para tanto, contou-se com os seguintes grupos experimentais: a) SHR – VEH: fêmeas da linhagem SHR que receberam VEH (n=8); b) SHR – FEN: fêmeas da linhagem SHR que receberam FEN (n=8); c) SLA16 – VEH: fêmeas da linhagem SLA16 que receberam VEH (n=8); e d) SLA16 – FEN: fêmeas da linhagem SLA16 que receberam FEN (n=8).

No teste de PLC, aos 48 e 49 dias de idade, os animais foram apresentados ao aparato (fase de pré-condicionamento). Nos dois dias subsequentes (50 e 51 dias) foram expostos ao FEN em um dos compartimentos do aparato (fase de

condicionamento) e VEH no compartimento oposto. Aos 52 dias os animais, sem receberem FEN ou VEH, tiveram acesso livre a todos os compartimentos do aparato para verificar o tempo de permanência em cada compartimento (fase de teste). Imediatamente após esse primeiro ensaio foi realizado um segundo (53 a 55 dias) e um terceiro ensaio (56 a 58 dias), conforme a Figura 3.

Os ratos receberam novas injeções de FEN aos 59, 60, 61 e 62 dias de idade, às 13h. Aos 61 dias de idade, os ratos foram testados no OF, no período entre 9 e 12h, ou seja, $22\pm 1h$ após a última administração de FEN. E, nos mesmos horários, aos 62 dias foram testados no LCE. Os animais foram eutanasiados aos 63 dias para coleta do NAc e posterior quantificação de DRD1, DRD2 e TH (conforme descrito no item 3.7). As doses de FEN foram de 4 mg/kg (i.p.).

Figura 3 - Esquema do segundo desenho experimental



Fonte: O autor. Administração de repetidas doses de FEN (4 mg/kg, i.p.) em fêmeas das linhagens SHR e SLA16. O teste de PLC foi realizado entre 48 e 58 dias. Após a fase de pré-condicionamento, fêmeas das linhagens SHR e SLA16 receberam FEN (4 mg/kg, i.p.) e/ou VEH por dois dias consecutivos (dias: 50/51, 53/54 e 56/57). No terceiro dia, a fase teste da PLC foi verificada por 15 min (dias: 52, 55 e 58). O teste de PLC foi repetido três vezes (ensaios). Os ratos receberam novas injeções de FEN aos 59, 60, 61 e 62 dias (13h). No período da manhã (8h – 12h), $22\pm 1h$ após a última administração de FEN, aos 61 dias de idade os ratos foram testados no CA, aos 62 dias no LCE e aos 63 dias os ratos foram eutanasiados. Círculos pretos indicam os dias em que os ratos receberam FEN.

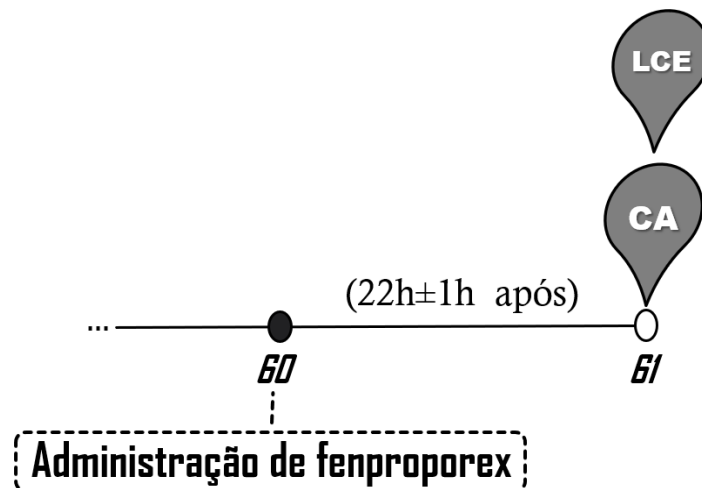
Em razão dos resultados observados na administração de doses repetidas de FEN (experimento 2), um segundo bloco experimental, contendo outros dois experimentos, foi delineado e executado.

3.4 SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL

3.4.1 Experimento 3: Administração de dose de FEN 22±1h antes dos testes

Em um terceiro experimento aos 60 dias de idade, ratas das linhagens SHR e SLA16 receberam uma única injeção de FEN (4 mg/kg, i.p.) ou VEH (0,9% NaCl, i.p.) às 13h (Figura 4). Aos 61 dias, 22±1h após a administração, os animais foram testados sequencialmente no CA e LCE para avaliação da atividade locomotora espontânea, reações estereotipadas, comportamento semelhante à ansiedade e funções autonômicas.

Figura 4 - Esquema do terceiro desenho experimental

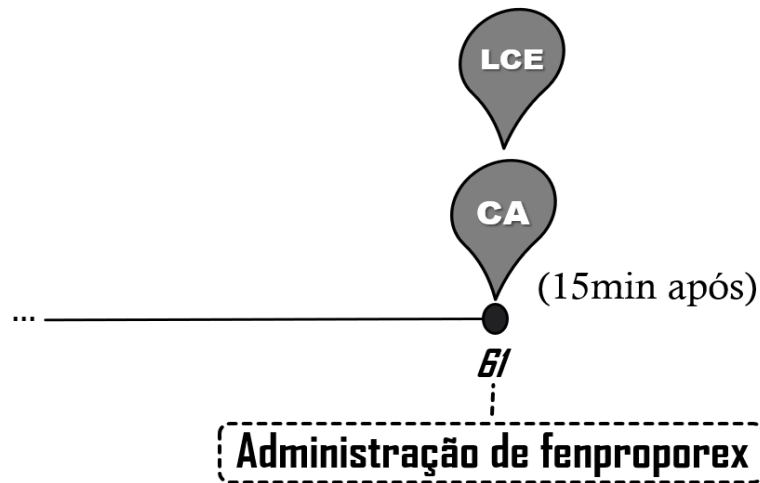


Fonte: O autor. Administração de dose única de FEN 22±1h antes dos testes (4 mg/kg, i.p.) em fêmeas das linhagens SHR e SLA16. Aos 60 dias houve administração de dose de FEN e aos 61 dias (22±1h após) os ratos foram testados sequencialmente no CA e LCE.

3.4.2 Experimento 4: Administração de dose de FEN 15min antes dos testes

Em um quarto experimento aos 61 dias de idade, ratas das linhagens SHR e SLA16 receberam uma única injeção de FEN (4 mg/kg, i.p.) ou VEH (0,9% NaCl, i.p.) e 15min após a administração foram testados sequencialmente no CA e LCE para avaliação da atividade locomotora espontânea, reações estereotipadas, comportamento semelhante à ansiedade e funções autonômicas (Figura 5).

Figura 5 - Esquema do quarto desenho experimental



Fonte: O autor. Administração de dose única de FEN 15min antes dos testes (4 mg/kg, i.p.) em fêmeas das linhagens SHR e SLA16. Aos 61 dias houve administração de dose de FEN e 15min após os ratos foram testados sequencialmente no CA e LCE.

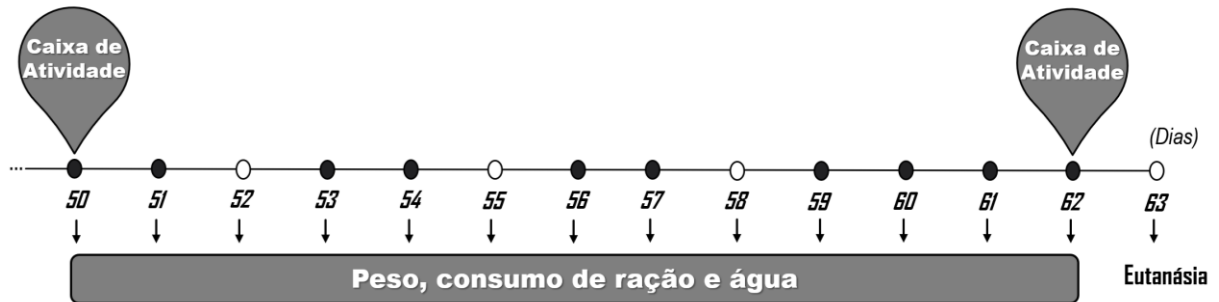
3.5 TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

3.5.1 Experimento 5: Administração de repetidas doses de FEN

A sensibilização comportamental, um modelo de estudo da farmacodependência, busca avaliar a hiperatividade locomotora gerada após a administração de drogas com potencial de abuso. Dessa forma, este experimento objetivou avaliar se o FEN pode potencializar a atividade locomotora nas fêmeas das linhagens SHR e SLA16.

O experimento 5 (Figura 6) testou os animais na caixa de atividade locomotora aos 50 e 62 dias, imediatamente após a administração de FEN ou VEH (conforme será descrito no item 3.6.3). Após o período de desmame, aos 28 dias, os animais foram organizados em duplas nas caixas de moradia para que não houvesse isolamento social. No período entre 50 e 62 dias de vida dos animais foi verificado diariamente o peso corporal e verificado o consumo de água e ração das duplas de animais. Para tanto, contou-se com os seguintes grupos experimentais: a) SHR – VEH: fêmeas da linhagem SHR que receberam VEH (n=8); b) SHR – FEN: fêmeas da linhagem SHR que receberam FEN (n=8); c) SLA16 – VEH: fêmeas da linhagem SLA16 que receberam VEH (n=8); e d) SLA16 – FEN: fêmeas da linhagem SLA16 que receberam FEN (n=8).

Figura 6 - Esquema do quinto desenho experimental



Fonte: O autor. Administração de repetidas doses de FEN (4 mg/kg, i.p.) em fêmeas das linhagens SHR e SLA16 para avaliação diária do peso e do consumo de água e ração por dupla de animais. A locomoção dos animais foi avaliada aos 50 e 62 dias de idade dos animais por dois dias consecutivos. Círculos pretos indicam os dias em que os ratos receberam FEN.

3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.6.1 Campo aberto (CA)

Desde o seu desenvolvimento por Hall (1934), o CA tornou-se uma ferramenta amplamente utilizada no estudo de comportamentos induzidos por psicofármacos. Em estudos psicofarmacológicos, os animais são normalmente colocados numa área nova para avaliação dos efeitos sobre a locomoção e comportamentos de emocionalidade do tipo medo e/ou ansiedade (para revisão ler CHOLERIS *et al.*, 2001; PRUT; BELZUNG, 2003).

O teste do CA foi realizado em uma arena de base quadrada preta com lados medindo 100 cm e cercado por paredes brancas de 40 cm de altura (Figura 7). O campo foi iluminado uniformemente (10 lux) e não foram permitidas imagens ou sons que distraíssem durante o procedimento de teste. No início do teste cada animal foi colocado na periferia do CA. Os comportamentos foram registrados continuamente por câmera de vídeo de alta resolução (2K) por 5min e registrados no computador (IZIDIO *et al.*, 2005). Todos os testes ocorreram no período matutino entre 9h e 12h. Todos os animais foram utilizados apenas uma vez, e após cada tentativa, a arena quadrada foi limpa com solução de etanol (10%, v/v) álcool para evitar a influência dos odores presentes no animal, a urina e bolos fecais dos ratos anteriores.

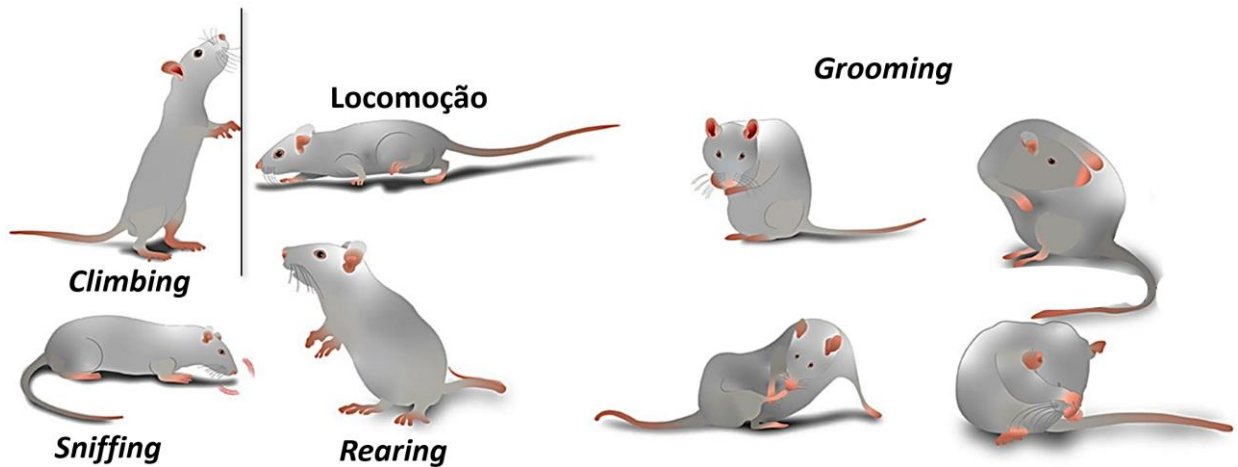
Figura 7 - Aparato utilizado no teste de CA



Fonte: O autor. Foto capturada do aparato de campo aberto (CA) do laboratório da genética do comportamento da UFSC.

Após registro por filmagem, por meio da observação de cada vídeo, com o auxílio de cronômetro e contador foi documentado as seguintes variáveis etológicas (Figura 8): número de movimentos verticais (n), números de movimento verticais na parede do aparato (*climbing*, n), número de movimentos verticais livres (*rearing*, n), número de cuidados de autolimpeza (*grooming*), número de defecações no aparato (n), tempo gasto em cheirar no aparato (*sniffing*, seg - segundos), tempos gasto no cuidado de autolimpeza (seg) e o tempo de latência para o cuidado de autolimpeza (seg) (ZHANG *et al.*, 2011). Com o auxílio do programa *Any-maze* (Stoelting, USA-versão 4.99m) foram mensurados: a distância total (m), a velocidade máxima (m/seg), o número de entradas na área central (n), o tempo gasto na região central (seg), o tempo gasto na região periférica (seg), tempo médio por visita ao centro (seg), tempo médio por visita a periferia (seg), a distância percorrida na região central (m) e a distância percorrida na região periférica (m). A região periférica compreendeu a área com distância de até 20 cm da parede lateral, enquanto a região central deu-se pela área da região quadrangular interna com lados de 80 cm. A permanência do animal na região periférica do aparato é classicamente interpretada como um comportamento defensivo do tipo medo e/ou ansiedade, uma vez que os animais tomam menos risco e conseguem realizar tigmotaxia nessa região (IZIDIO *et al.*, 2005; CHOLERIS *et al.*, 2001; PRUT; BELZUNG, 2003).

Figura 8 - Sumarização do estudo etológico no CA



Fonte: Adaptado de Deurwaerdère *et al.*, 2022.

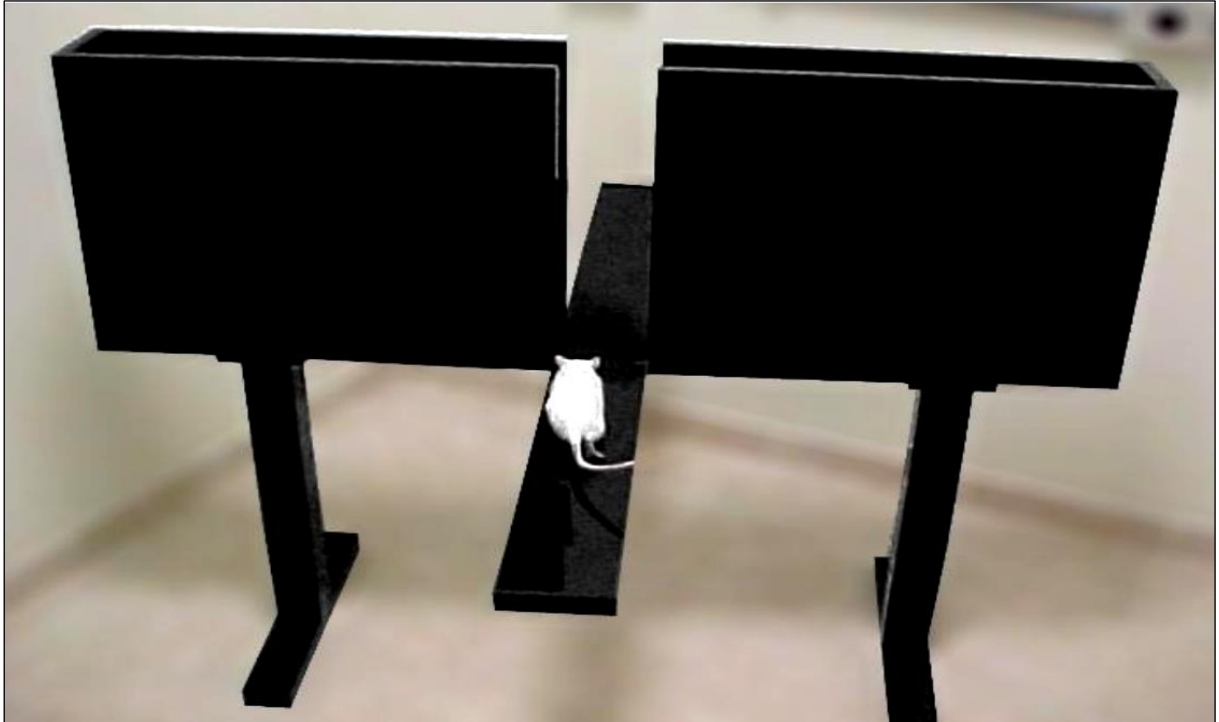
3.6.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste de LCE, desde a sua validação por Handley e Mithani (1984), é amplamente utilizado para investigar as bases psicológicas e neuroquímicas de comportamento do tipo medo e/ou ansiedade, bem como a descoberta de novos agentes ansiolíticos (para revisão ler RODGERS; DALVI, 1997; WALF; FRYE, 2007).

Para o teste de LCE foi realizado em um aparato de madeira preto com base em forma de cruz elevada a 52 cm do solo (Figura 9). A região central (10 cm) oferece acesso a quatro braços de igual tamanho (50 x 10 cm; comprimento x largura) dispostos perpendicularmente, sendo dois braços opostos cercados por paredes de 40 cm de altura e dois braços abertos. É reconhecido que os braços abertos do labirinto combinam elementos naturalmente hostis: por serem um ambiente novo e em espaço aberto. Os testes comportamentais ocorreram no período matutino (entre 9h e 12h) com duração de 5min e sob luz indireta mantida em 10 lux. Entre cada procedimento, o aparato foi devidamente limpo com solução de etanol (10%, v/v). Cada animal foi colocado na região central com a face voltada para um braço fechado. Após registro por filmagem com câmera de alta resolução (2K) posicionada acima do aparato, com o auxílio do programa Any-maze (Stoelting, USA- versão 4.99m) foram mensurados: a distância total percorrida (m), o número de entradas (n) e o tempo de permanência em cada um dos braços (seg). Os parâmetros de porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos foram calculados e expressos

utilizando-se a seguinte fórmula: $[(\text{braços abertos} / (\text{braços abertos} + \text{braços fechados})) \times 100]$ (IZIDIO *et al.*, 2005).

Figura 9 - Aparato utilizado no teste do LCE



Fonte: Medeiros (2012). Foto capturada do aparato labirinto em cruz elevado (LCE) do laboratório da genética do comportamento da UFSC.

3.6.3 Caixa de atividade locomotora

A sensibilização comportamental é um fenômeno manifestado pelo aumento progressivo da atividade locomotora após a exposição repetida e intermitente a uma substância estimulante, sendo que por décadas é utilizada como modelo de estudo no desenvolvimento da dependência (VENDRUSCOLO *et al.*, 2008; SAX e STRAKOWSKI, 2001; CHEN; CHEN; CHIANG, 2009). O registro da atividade locomotora dos animais foi realizado através do teste na caixa de atividade (Figura 10). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 70 x 27 x 22 cm (largura x altura x comprimento), a qual é fechada superiormente por uma tampa de acrílico transparente e possui assoalho suspenso por tela metálica. Ao longo da caixa são distribuídos 3 emissores de luz infravermelho que ao serem interrompidos geram automaticamente o registro de uma unidade de medida da atividade locomotora em um display digital acoplado ao aparato. Os testes comportamentais ocorreram no

período matutino (entre 9h e 12h), e entre cada procedimento o aparato foi devidamente limpo com solução de etanol (10%, v/v). Para a realização do teste, imediatamente após receberem injeções de VEH ou FEN, os animais foram introduzidos no interior do aparato, cuja luminosidade foi mantida em 10 lux. A atividade locomotora total foi registrada por 60min, bem como foram registradas as medidas de locomoção a cada 5min por meio de filmagem com câmera suspensa. O número de bolos fecais foi contabilizado (PARO *et al.*, 2008; GRANZOTTO, 2016).

Figura 10 - Aparato utilizado no teste de atividade locomotora



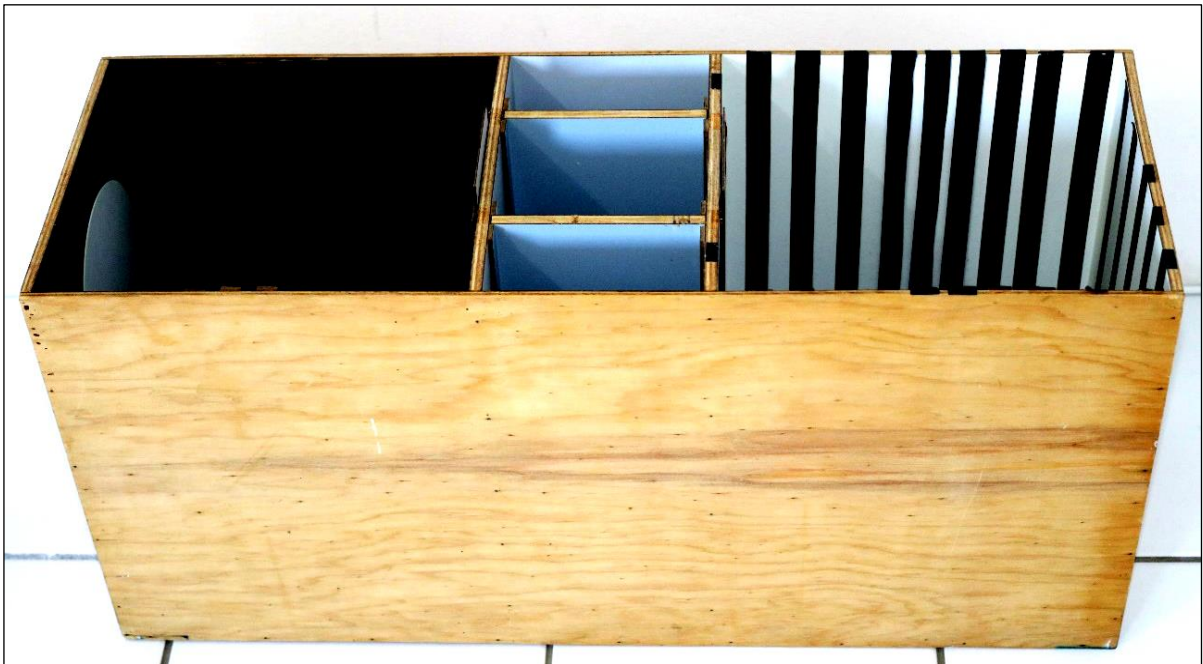
Fonte: Medeiros (2012). Foto capturada do aparato caixa de atividade do laboratório da genética do comportamento da UFSC.

3.6.4 Teste de preferência por local condicionado (PLC)

O paradigma de PLC é um modelo comportamental pré-clínico padrão usado para estudar os efeitos hedônicos e aversivos das drogas. Embora vários designs e aparatos diferentes sejam usados neste modelo, as características básicas desta tarefa envolvem a associação de um ambiente particular com a droga, seguido pela associação de um ambiente diferente com a ausência dessa (administração de VEH) (BERRO *et al.*, 2018; METZ *et al.*, 2019; PRUS *et al.*, 2009). Utilizamos neste projeto um aparato de três compartimentos com características diferentes (Figura 11). O compartimento central não possuía características especiais, continha portas removíveis que quando abertas permitiam a passagem livre do animal entre todos os

compartimentos. Os compartimentos laterais possuíam características distintas (*unbiased*), onde o compartimento intitulado de A possuía o chão levemente rugoso e as paredes brancas com listras pretas (25 x 30 x 35 cm), enquanto o compartimento B possuía o chão liso e paredes pretas com círculo branco (25 x 30 x 35 cm) (GONÇALVES *et al.*; 2013, 2015; REZIN *et al.*, 2011; TOGNONI; MORSELLI; GARANTTINI, 1972).

Figura 11 - Aparato utilizado no teste de PLC



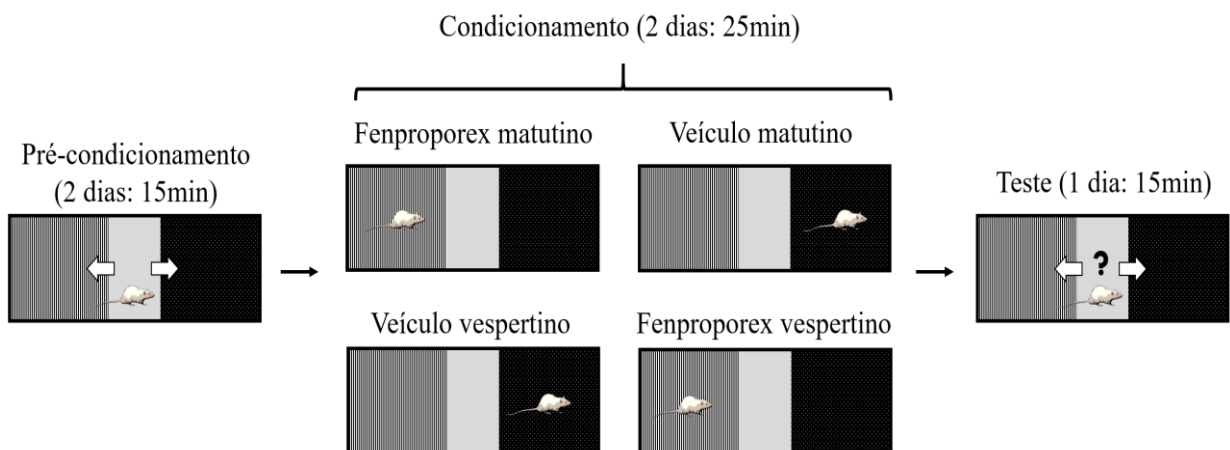
Fonte: O autor. Foto capturada do aparato de preferência por local condicionado (PLC) do laboratório da genética do comportamento da UFSC.

O protocolo experimental de CPL consistiu das etapas de pré-condicionamento, de condicionamento e de teste (adaptado de THÉBERGE *et al.*, 2010; BERRO *et al.*, 2018). Na etapa de pré-condicionamento, por dois dias consecutivos os animais puderam explorar todo o aparato por 15 min uma vez que as portas do mesmo foram removidas. Durante a etapa de condicionamento, o animal do grupo experimental recebeu no período matutino uma injeção de FEN e após 15 min foi colocado em um dos compartimentos laterais por 25 min, enquanto no período vespertino recebeu uma injeção de solução VEH e foi colocado no compartimento oposto igual tempo. O animal foi colocado no local de pareamento com a droga após 15 min da administração do FEN em razão deste ser o tempo decorrido para a obtenção do pico encefálico de anfetamina (COUTTS *et al.*, 1986). O compartimento associado com a droga foi

randomizado e mantido até o final do experimento. No segundo dia da etapa de condicionamento foi repetido o procedimento, sendo que o VEH foi aplicado no período matutino e a droga no período vespertino, de modo a não condicionar o possível efeito da droga com o período de administração. Posteriormente, foi realizada uma sessão de teste, que consistiu em colocar o animal no compartimento central sem a administração de nenhum composto e depois retirar as portas de acesso aos compartimentos. Durante 15min registrou-se com câmera de alta resolução (2K) o tempo em que o animal permaneceu em cada um dos compartimentos. Uma preferência de lugar condicionada foi encontrada quando os animais passam significativamente mais tempo no compartimento emparelhado com a droga do que no compartimento emparelhado com o VEH. As etapas de condicionamento foram repetidas por mais duas vezes, caracterizando 3 ensaios.

Durante todas as etapas da CPL a iluminação foi indireta e equivalente em todo o aparato (10 lux), bem como o ambiente livre de ruídos. As etapas de pré-condicionamento e teste foram realizadas sempre no período matutino, já a etapa de condicionamento foi realizada no turno da manhã, entre 8 h e 12 h, e da tarde, entre 14 h e 18 h. Entre cada procedimento, o aparato foi devidamente limpo com solução de etanol a 10%. O tempo em cada compartimento obtido por meio da utilização do programa *Any-maze* (Stoelting, USA- versão 4.99m). A porcentagem de tempo no compartimento foi calculada com base na fórmula: $[\text{compartimento droga} \times 100 / \text{compartimento droga} + \text{compartimento não droga}]$.

Figura 12 – Esquema de um ensaio do teste de PLC



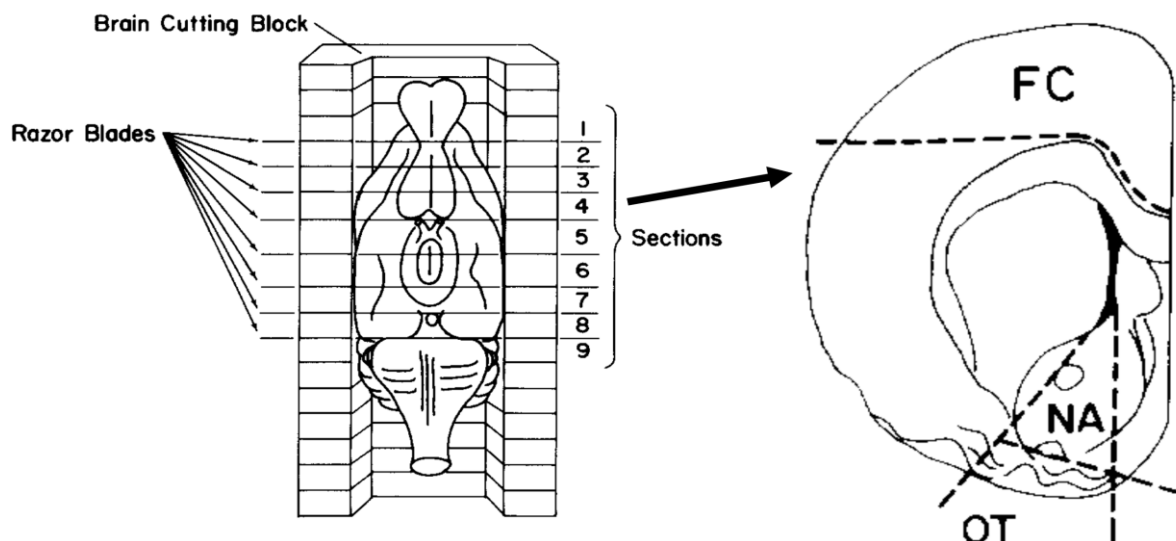
Fonte: O autor. Etapas sequenciais de um ensaio do teste de preferência por local condicionado (PLC).

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE TH, DRD1 E DRD2

3.7.1 Eutanásia e coleta do NAc

Após anestesia com isoflurano (5% por litro de oxigênio, via inalatória), no período matutino, houve decapitação dos animais com guilhotina, craniotomia e imediata remoção do encéfalo. Os encéfalos retirados foram imediatamente lavados em solução salina refrigerada e dissecados para coleta no NAc. Com o encéfalo disposto em decúbito dorsal sobre uma superfície de metal resfriada com gelo, realizando uma secção coronal na região mais anterior do quiasma óptico (Bregma - 0.26 mm) e outra realizada 2mm anterior a região mais anterior do quiasma óptico (Bregma - 1.70 mm) (COMPTON; JOHNSON, 1998; LIANG *et al.*, 2004). A partir dessa secção coronal, cada NAc por meio dos seguintes cortes: a) um corte diagonal do assoalho do ventrículo lateral, passando lateralmente pela comissura anterior, para o bordo medial do trato olfatório lateral; b) um corte vertical do assoalho do ventrículo lateral à base do encéfalo; c) um corte separando o tubérculo olfatório (localizado na base desta cunha), o qual está ligeiramente inferior ao NAc (Figura 13) (HEFFNER *et al.*, 1980). O NAc foi coletado bilateralmente (totalizando aproximadamente 3 mg por animal), acondicionados no interior de microtubos, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e mantidos em *ultrafreezer* a -80°C para posterior quantificação de TH, DRD1 e DRD2 por meio da técnica de *Western Blot* (LU *et al.*, 2003).

Figura 13 – Localização e coleta do NAc



Fonte: Adaptado de HEFFNER *et al.*, 1980.

3.7.2 Preparação das amostras

Após o descongelamento dos tecidos e acomodação dos microtubos no gelo, foi pipetado 80 uL em cada microtubo de solução contendo coquetel de inibidores enzimáticos (1%, Sigma, St. Louis, MO, EUA). As amostras foram levadas rapidamente ao sonicador dentro do gelo seco e homogeneizadas 3 vezes durante 5seg (Figura 14). Após a homogeneização, deixou-se o lisado em gelo comum até a centrifugação das mesmas na temperatura de 4°C, velocidade de 13200 rpm, durante 10 min (Figura 14). Após a centrifugação, o sobrenadante foi pipetado para realização da dosagem de proteínas.

Figura 14 – Sonicador e centrífuga utilizados na preparação da amostra



Fonte: O autor. Foto do sonicador (Sonics VCX 130 da Vibra-Cell) e centrífuga (accuSpin Micro 17R da Fisher Scientific) utilizados para processamento das amostras do NAC na UNIFESP.

3.7.3 Dosagem de proteínas totais

Para dosagem de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (KRUGER, 2009). Sendo que para cada tubo foi realizada uma leitura em duplicata. Em uma microplaca de 96 poços foi pipetada solução para a curva de calibração (albumina) e das amostras para quantificação das proteínas. Levou-se a placa ao leitor de microplacas de absorvância (Figura 15) no comprimento de onda de 595nm. Com os valores obtidos foi possível montar a curva de calibração e calcular a quantidade de proteína de cada amostra.

Figura 15 – Placa e espectrofotômetro utilizados na dosagem de proteínas

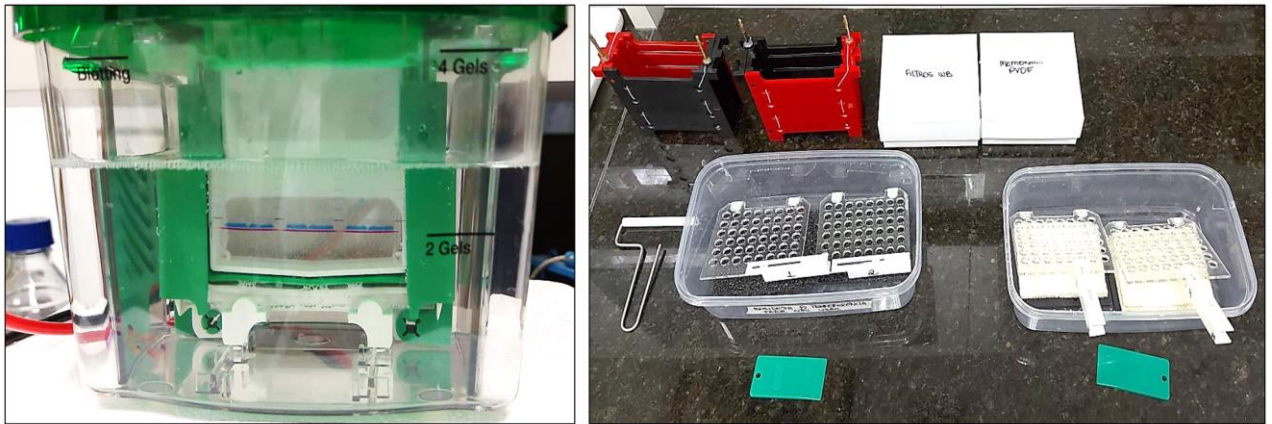


Fonte: O autor. Foto de microplaca de 96 poços e espectrofotômetro (SPECTROstar Nano da BMG LABTECH) utilizados na dosagem de proteínas durante a padronização da técnica de Western Blotting na UNIFESP.

3.7.4 “Western blotting”

Alíquotas contendo de 20 µg de proteínas total foram carregadas e submetidas à eletroforese em gel dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%, qual foi transferido para membrana de nitrocelulose a 400 mA por 1h (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) (Figura 16). Após as membranas serem bloqueadas de sítios inespecíficos por solução tampão de bloqueio (albumina 2% em tampão TBS-T 0,1%), as mesmas foram incubadas com anticorpo primário durante 24h sob agitação constante na temperatura de 4°C, incluindo anticorpo monoclonal de DRD1 (1/1000; Santa Cruz Biotechnology, NO.sc-33660), anticorpo monoclonal de DRD2 (1/500; Santa Cruz Biotechnology, NO.sc-5303), anticorpo policlonal anti-TH (1/5000; Millipore, No.ab152) e anticorpo policlonal anti-GAPDH (1/20000; Bioworld Technology). Posteriormente, as membranas foram lavadas em solução PBS (três vezes de 10min) e incubadas com anticorpos secundários (anti-cabra ou anti-camundongo, 1:5000, Biotime Institute of Technology) conjugados a peroxidase-streptavidina, por 1h à temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas em solução PBST (três vezes de 10min). Após a aplicação do revelador SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific™) as bandas de proteínas transferidas foram visualizadas, capturadas e analisadas pelo aparelho foto-documentador UVITEC 4.7 Cambridge.

Figura 16 – Corrida das proteínas no gel e transferência para membrana



Fonte: O autor. Foto do equipamento de *western blotting* (Mini Trans-Blot® Cell e Criterion™ Blotter da BIO-RAD) utilizados na quantificação de proteínas na UNIFESP.

3.7.5 Peso, consumo de água e ração

Durante o período de administração de solução de FEN ou VEH os animais foram acondicionados em duplas nas caixas de moradia para que não ocorresse estresse por isolamento social. O registro do peso diário e acompanhamento do ganho de peso dos animais (de fórmula: [peso final – peso inicial]) foi realizado por meio da balança digital SF-400 (Electronic®). O consumo de ração (gramas) foi monitorado e registrado diariamente por meio da balança digital SF-400 (Electronic®), enquanto o de água (ml) por proveta de vidro de 500ml.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Uma vez que todos os dados apresentaram homocedasticidade (Teste de Levene, $P > 0,05$) e se distribuíram normalmente (Teste de Kolmogorov-Smirnov, $P > 0,05$), os mesmos foram analisados com testes paramétricos. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média, com conclusões estatísticas estimadas em 5% de significância. Os resultados foram analisados através de testes de análise de variância (ANOVA) e o teste de Duncan como post hoc. Para comparação de duas amostras, o teste t de *Student* foi utilizado. Os dados foram analisados utilizando o programa Statistica 7® e os gráficos produzidos com o auxílio do programa GraphPad Prism 5®.

4. RESULTADOS

4.1 PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

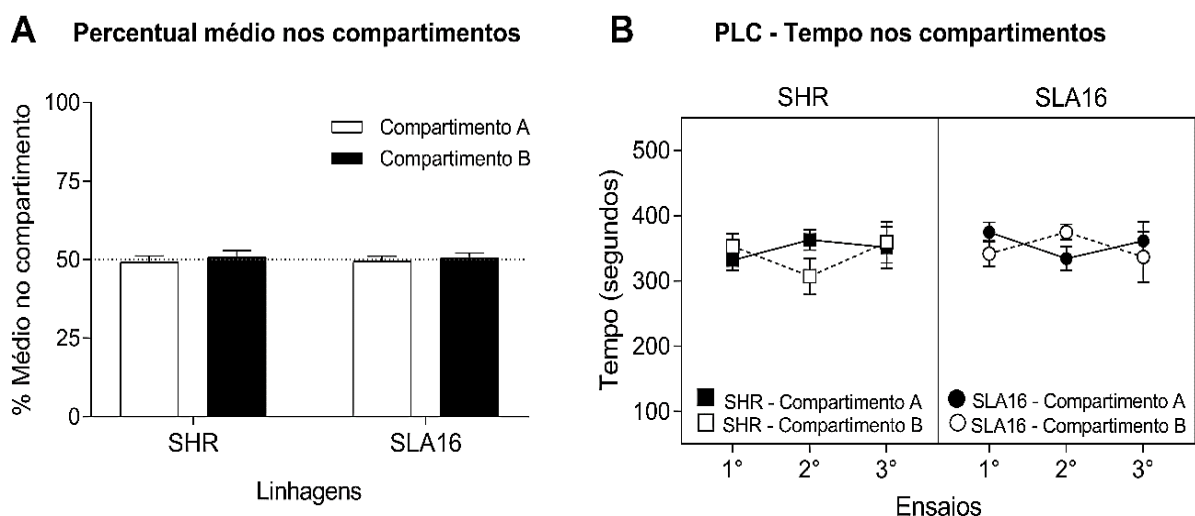
4.1.1 Experimento 1: Teste de permanência de *naïves* nos compartimentos PLC

Nesse experimento, um grupo *naïve* de fêmeas das linhagens SHR e SLA16 foram testadas aos 52, 55 e 58 dias de idade quanto a preferência de permanência nos compartimentos A ou B no aparato de PLC sem a administração de FEN ou VEH. Após a aplicação de uma ANOVA de dois fatores observou-se que não houve diferença entre o percentual médio de permanência nos compartimentos A e B [$F(1,28)=0,99$; $p=0,32$] ou entre linhagens [$F(1,28)=0,05$; $p=0,82$] (Figura 17A).

Bem como, observou-se por meio de uma ANOVA de medidas repetidas que não houve diferença de tempo de permanência no compartimento A ou B [$F(1,28)=0,17$; $p=0,67$], bem como entre as linhagens SHR e SLA16 [$F(1,28)=0,30$; $p=0,58$], durante a realização do 1°, 2° e 3° ensaio, os quais ocorreram respectivamente aos 52, 55 e 58 dias de vida dos animais (Figura 17B).

Estes resultados sugerem que o contexto se apresentou imparcial (*unibased*) para ratas de ambas as linhagens.

Figura 17 – Fêmeas SHR e SLA16 *naïve* testadas no aparato de PLC



Fonte: O autor. Tempo de permanência de grupo *naïve* nos compartimentos A ou B, observado no paradigma de PLC durante 3 ensaios em animais fêmeas das linhagens SHR e SLA16. **(A) Percentual médio no compartimento:** média aritmética do percentual dos ensaios, ($p<0,05$). **(B) Tempo no compartimento:** tempo gasto em segundos no compartimento A ou B em cada ensaio ($p<0,05$). Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 8 animais em cada grupo. (A) Teste ANOVA de dois fatores e (B) teste ANOVA de medidas repetidas seguido por teste de comparação de Duncan.

4.1.2 Experimento 2: Administração de doses repetidas de FEN

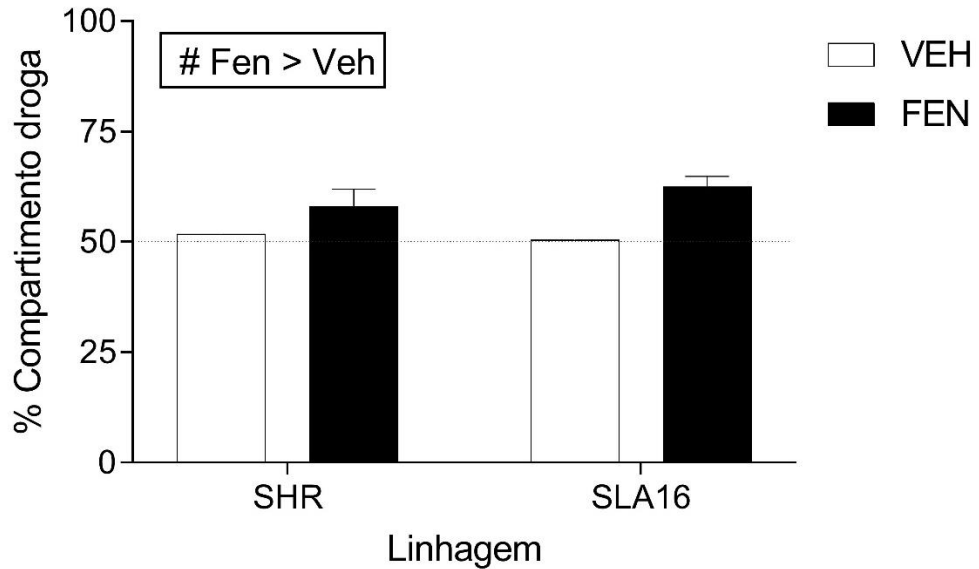
4.1.2.1 Influência do FEN no teste de PLC

No experimento 2, ratas das linhagens SHR e SLA16 foram testados no teste de PLC ao FEN aos 52, 55 e 58 dias de idade conforme previamente descrito (Figura 4). No paradigma de PLC, após a aplicação de uma ANOVA de dois fatores, observou-se que o percentual médio de permanência no compartimento droga foi maior nos grupos tratados com FEN do que nos grupos tratados somente com VEH [$F(1,28)=13,56$; $p<0,01$] (Figura 18A).

Da mesma forma, uma ANOVA com medidas repetidas revelou que os ratos dos grupos tratados com FEN foram induzidos a permanecer mais tempo no compartimento droga do que os grupos tratados somente com VEH [$F(1,23)=8,27$; $p<0,01$] (Figura 18B). E, que o tempo de permanência no compartimento da droga pela linhagem SLA16 foi maior do que pela linhagem SHR [$F(1,23)=4,07$; $p<0,01$] (Figura 18B). Teste *post-hoc* mostraram uma diferença entre o tratamento de FEN e VEH em SLA16 no 1º, 2º e 3º ensaios. Uma diferença de tratamento ocorreu nos SHR no 3º ensaio (Figura 18B).

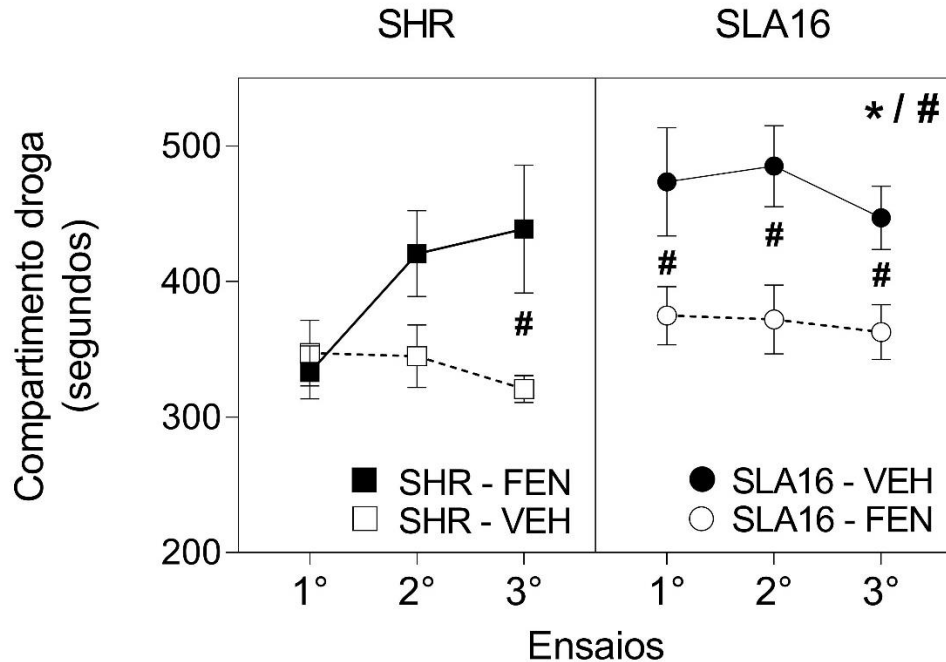
Figura 18 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no compartimento droga do aparato de PLC

A PLC - Percentual médio no compartimento droga



B

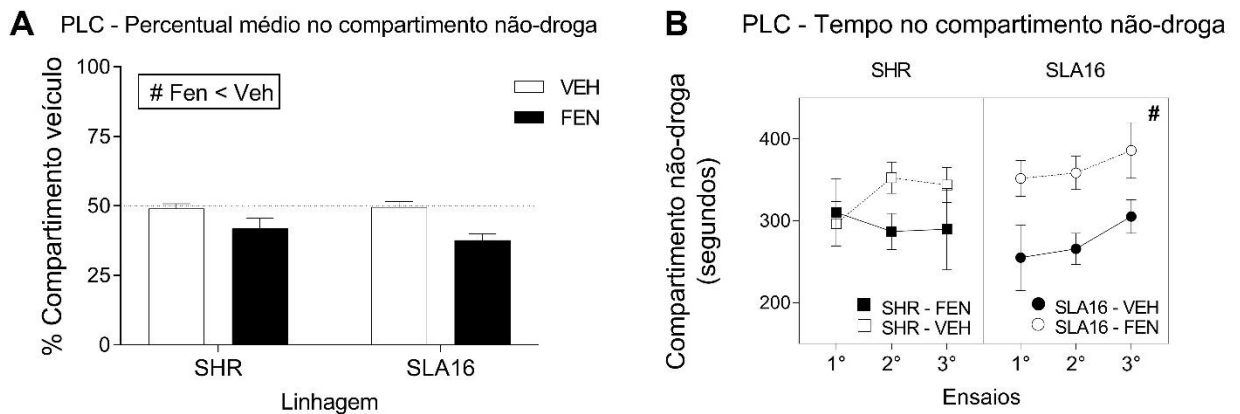
PLC - Tempo no compartimento droga



Fonte: O autor. Comportamento de preferência por droga induzido pelo FEN, observado no paradigma de PLC por meio de 3 ensaios em animais fêmeas das linhagens SHR e SLA16. **(A) Percentual médio no compartimento droga:** média aritmética do percentual dos ensaios (# $p < 0.05$ FEN > VEH). **(B) tempo no compartimento droga:** tempo gasto em segundos no compartimento droga em cada ensaio (# $p < 0.05$ FEN > VEH; * $p < 0.05$ SLA16 > SHR). Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 8 animais em cada grupo. (A) Teste ANOVA de dois fatores ou (B) teste ANOVA de medidas repetidas seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Após a aplicação de uma ANOVA de dois fatores, ao analisar o percentual médio de permanência no compartimento não-droga, observou-se que o mesmo foi menor nos grupos tratados com FEN do que nos tratados somente com VEH [F(1,28)=13,86; $p<0,01$] (Figura 19A). Em relação ao tempo de permanência no compartimento não-droga uma ANOVA com medidas repetidas revelou que os ratos tratados com FEN permaneceram menos tempo no compartimento não-droga do que os animais tratados unicamente com VEH [F(1,27)=6,72; $p<0,01$] (Figura 19B).

Figura 19 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no compartimento não-droga do aparato de PLC



Fonte: O autor. Tempo de permanência no compartimento não-droga, observado no paradigma de PLC durante 3 ensaios em animais fêmeas das linhagens SHR e SLA16. **(A) Percentual médio no compartimento não-droga:** média aritmética do percentual dos ensaios, onde o percentual corresponde à média de tempo dos ensaios no compartimento analisado $\times 100$ / média de tempo dos ensaios no compartimento analisado + média de tempo dos ensaios no compartimento oposto ($\# p<0.05$ FEN<VEH). **(B) Tempo no compartimento não-droga:** tempo gasto em segundos no compartimento não-droga em cada ensaio ($\# p<0.05$ FEN<VEH). Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 8 animais em cada grupo. (A) Teste ANOVA de dois fatores ou (B) teste ANOVA de medidas repetidas seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

4.1.2.2 Influência do FEN no teste de CA: grupos de repetidas doses

Após a realização do teste de PLC, os animais receberam novamente FEN ou VEH aos 59 e 60 dias de idade. E, aos 61 dias de vida observou-se no CA ($22\pm 1h$ após a última aplicação), por meio de testes de ANOVA de dois fatores, que a administração de doses repetidas de FEN aumentou o tempo de permanência na área periférica [F(1,28)=8,23; $p=0,01$] (Figura 20F), o tempo médio de duração de cada visita à periferia [F(1,27)=9,06; $p=0,01$] (Figura 22B), bem como, o número

[F(1,28)=12,94; p=0,01] (Figura 23C) e tempo do comportamento de *grooming* [F(1,28)=18,46; p=0,01] (Figura 23B).

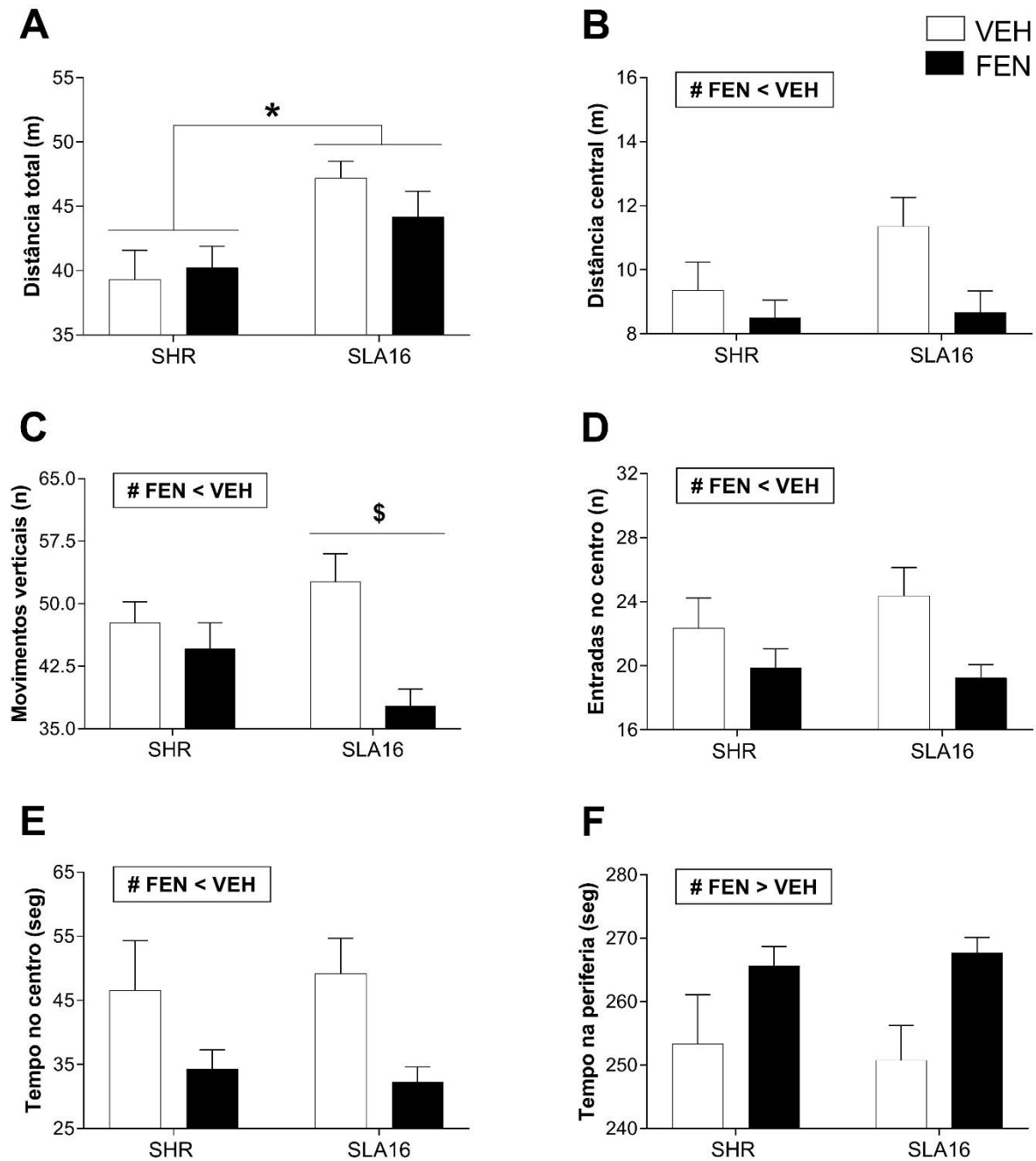
Na área central do aparato, o tratamento com FEN também diminuiu o número de entradas [F(1,28)=6,67; p=0,01] (Figura 20D), a distância percorrida [F(1,28)=5,45; p=0,02] (Figura 20B), o tempo médio de duração de cada visita [F(1,28)=4,08; p=0,01] (Figura 22A) e o tempo de permanência [F(1,28)=8,23; p=0,01] (Figura 20E) em comparação aos grupos tratados somente com VEH. Nenhuma diferença de tratamento foi observada em relação a distância total [F(1,28)=0,32; p=0,57] (Figura 20A) e periférica percorrida [F(1,28)=0,17; p=0,68] (Figura 21B), velocidade máxima [F(1,28)=2,25; p=0,14] (Figura 21A) e tempo de *sniffing* [F(1,28)=0,06; p=0,80] (Figura 23A). Observou-se que em decorrência da diminuição de execução dos movimentos de *climbing* [F(1,28)=6,02; p=0,02] (Anexo A) e *rearing* [F(1,28)=4,75; p=0,03] (Anexo A), a realização de movimentos verticais foi menos frequente por parte dos grupos FEN do que dos grupos VEH [F(1,28)=10,44; p=0,01] (Figura 20C).

A aplicação de testes ANOVA de dois fatores também demonstrou que a linhagem SLA16 percorreu maior distância total [F(1,28)=10,31; p=0,01] (Figura 20A) e distância na área periférica do aparato [F(1,28)=7,49; p=0,01] (Figura 21B) quando comparado à linhagem SHR. O tempo de realização do comportamento de *sniffing* [F(1,28)=10,61; p=0,01] (Figura 23A) e a latência para realização do comportamento de *grooming* [F(1,28)=10,36; p=0,01] (Figura 23D) foram maiores na linhagem SLA16 do que na SHR; enquanto o tempo [F(1,28)=17,80; p=0,01] e número [F(1,26)=9,00; p=0,01] de realizações do comportamento de *grooming* foram maiores na linhagem SHR do que na SLA16 (Figura 23B e 23C).

Observou-se uma interação frente ao número de movimentos verticais no teste do CA, onde o FEN diminuiu especificamente os movimentos da linhagem SLA16 [F(1,28)=4,45; p=0,04] (ANOVA de dois fatores, Figura 20C). O movimento padrão dos ratos e a plotagem de ocupação referente a 10 segundos podem ser observados respectivamente nas figuras R5 (C, D, E e F) e R6 (C, D, E, F e G) para auxiliar visualmente na compreensão dos resultados apresentados.

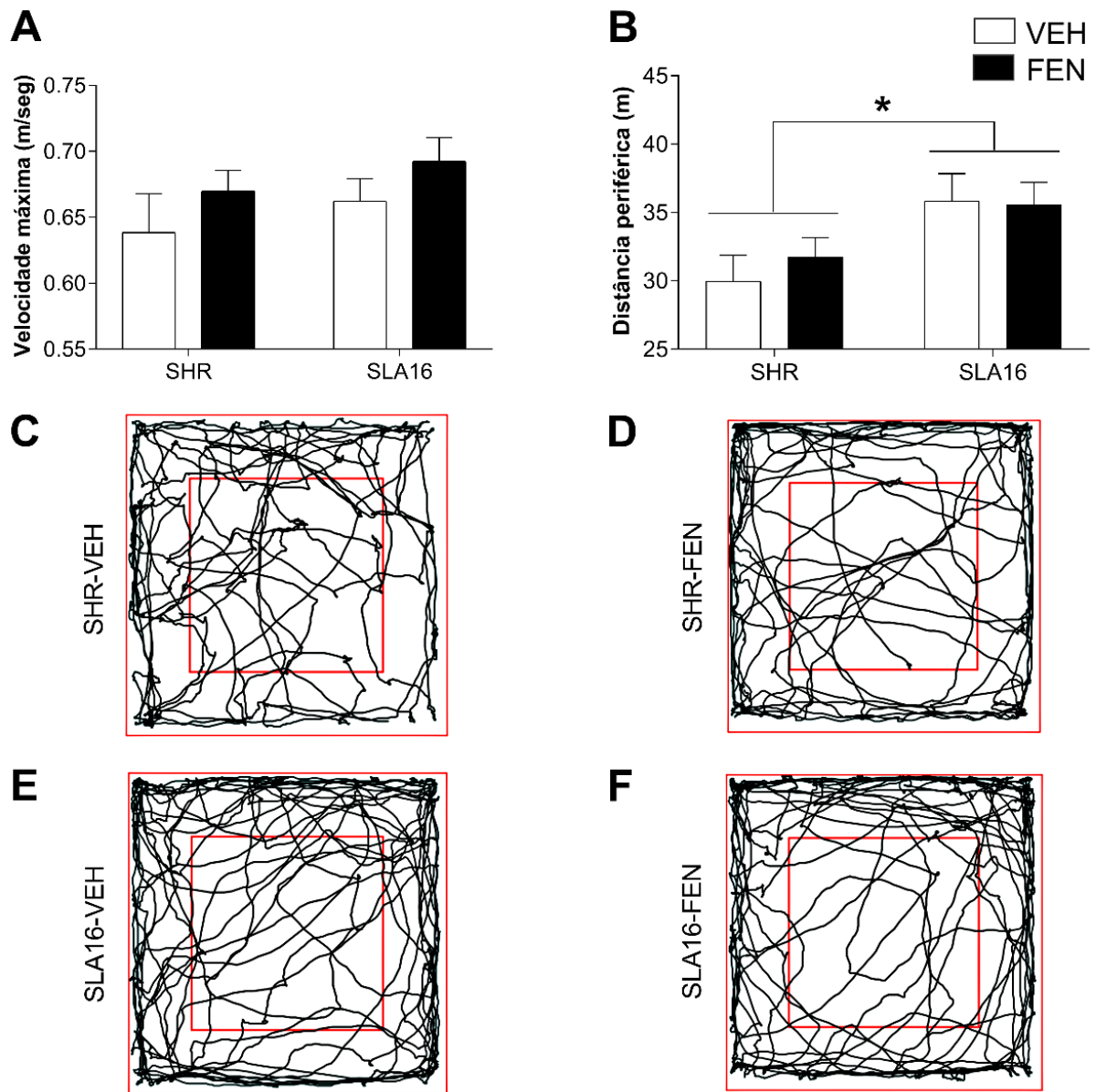
Não houve diferenças estatísticas observadas em relação a defecação, uma vez que nenhum dos animais defecou durante os 5 min de realização dos testes (Dados complementares – Anexo A).

Figura 20 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de CA (Dados 1)



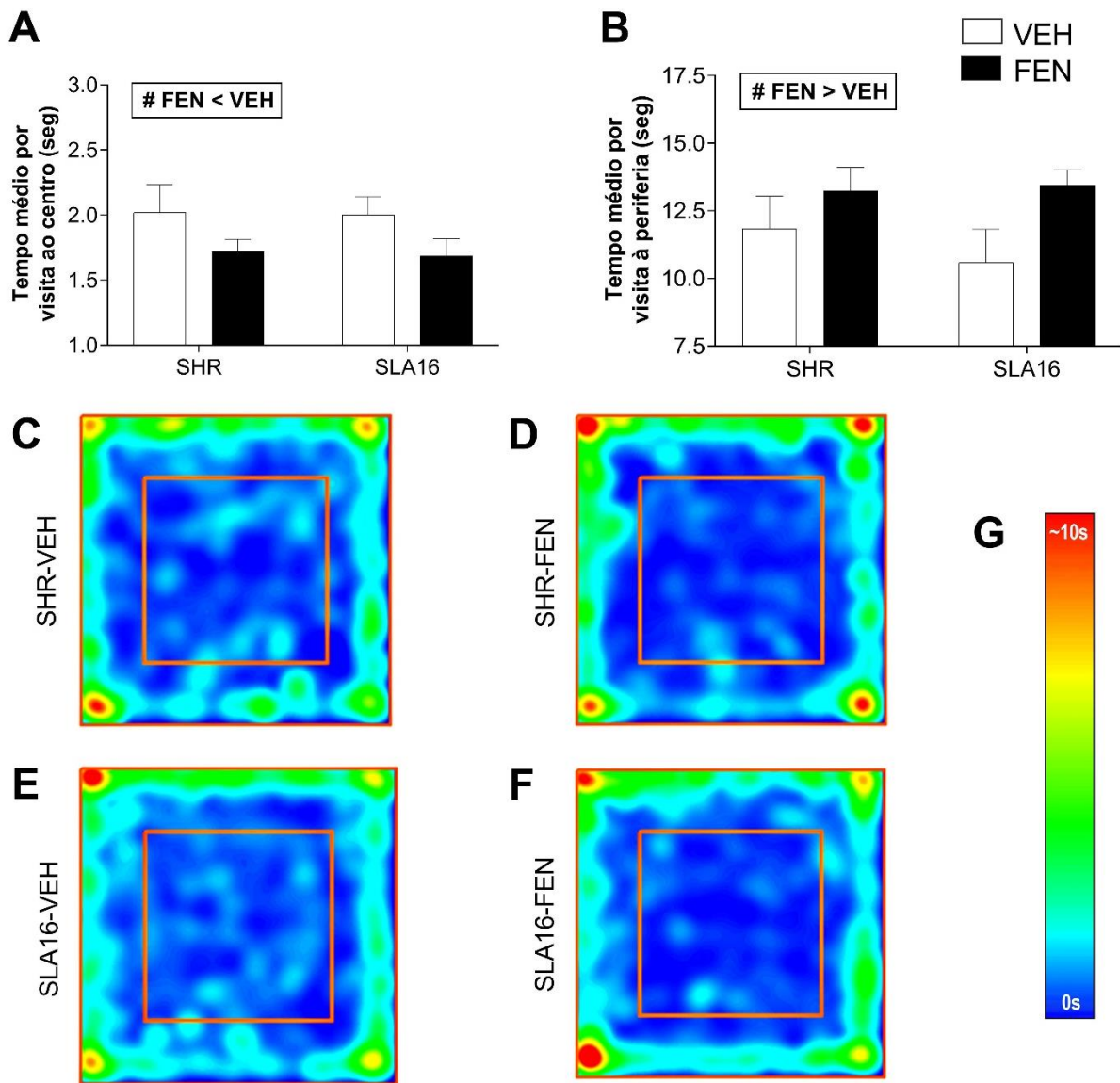
Fonte: O autor. O efeito da administração de doses repetidas de FEN (4 mg/kg) e/ou VEH sobre o comportamento no CA durante 5min. O teste de CA foi realizado 22±1h após a última administração de FEN. **(A) Distância total:** distância percorrida em metros (* $p < 0,05$ SLA16>SHR). **(B) Distância central:** distância percorrida em metros na área central (# $p < 0,05$ FEN<VEH). **(C) Movimento verticais:** número de movimentos totais de elevações sobre duas patas (\$ $p < 0,05$ SLA16-VEH>SLA16-FEN; # $p < 0,05$ FEN<VEH). **(D) Entradas no centro:** número de entradas na área central (# $p < 0,05$ FEN<VEH). **(E) Tempo no centro:** tempo gasto na área central do aparato (# $p < 0,05$ FEN<VEH). **(F) Tempo na periferia:** tempo gasto na área periférica do aparato (# $p < 0,05$ FEN>VEH). Os resultados foram expressos em média ± EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Figura 21 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de CA (Dados 2)



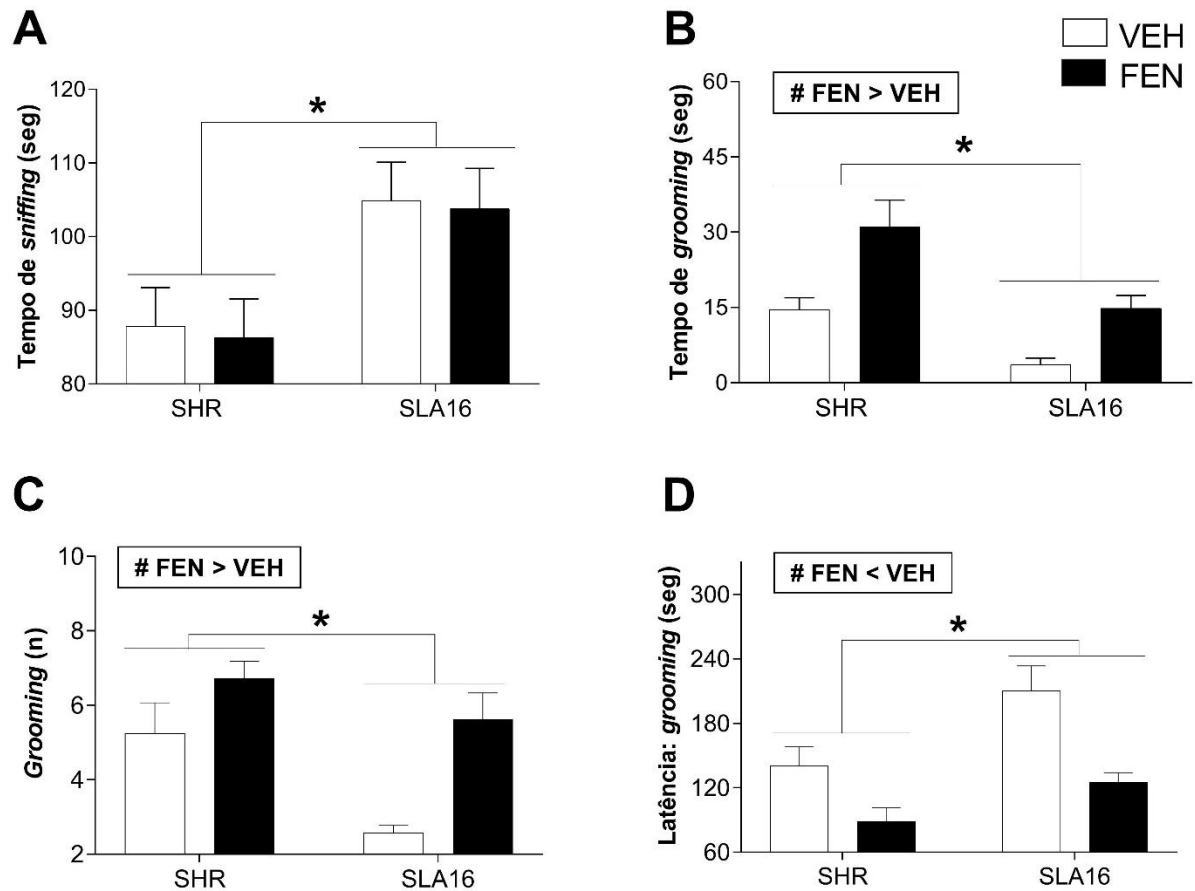
Fonte: O autor. O efeito da administração de doses repetidas de FEN (4 mg/kg) e/ou VEH sobre o comportamento no CA durante 5 min. O teste de CA foi realizado 22±1h após a última administração de FEN. **(A) Velocidade máxima:** velocidade média realizada em centímetros por segundo. **(B) Distância periférica:** distância percorrida em metros na área periférica (* p<0,05 SLA16>SHR). **(C) SHR-VEH:** movimento padrão do rato SHR 22±1h após a administração de VEH. **(D) SHR-FEN:** movimento padrão do rato SHR 22±1h após a administração de FEN. **(E) SLA16-VEH:** movimento padrão do rato SLA16 22±1h após a administração de VEH. **(F) SLA16-FEN:** movimento padrão do rato SLA16 22±1h após a administração de FEN. Os resultados foram expressos em média ± EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Figura 22 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de CA (Dados 3)



Fonte: O autor. O efeito da administração de doses repetidas de FEN 4 mg/kg e/ou VEH sobre tempo médio de duração de cada visita e tempo de permanência no CA durante 5 min. O teste de CA foi realizado 22±1h após a última administração de FEN. **(A) Tempo médio por visita ao centro:** quantidade média de segundos de permanência na região central do aparato (# p<0,05 FEN<VEH). **(B) Tempo médio por visita à periferia:** quantidade média de segundos de permanência na região periférica do aparato (# p<0,05 FEN>VEH). **(C) SHR-VEH:** plotagem de ocupação do rato SHR 22±1h após a administração de VEH. **(D) SHR-FEN:** plotagem de ocupação do rato SHR 22±1h após a administração de FEN. **(E) SLA16-VEH:** plotagem de ocupação do rato SLA16 22±1h após a administração de VEH. **(F) SLA16-FEN:** plotagem de ocupação do rato SLA16 22±1h após a administração de FEN. **(G) Escala:** escala equivalente a plotagem de ocupação, tendo intervalo de 0 (cor azul) a 10 segundos (cor vermelha). Os resultados foram expressos em média ± EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Figura 23 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de CA (Dados 4)



Fonte: O autor. O efeito da administração de doses repetidas de FEN (4 mg/kg) e/ou VEH sobre o comportamento no CA durante 5 min. O teste de CA foi realizado 22±1h após a última administração de FEN. **(A) Tempo de *sniffing***: Comportamento de farejar o ambiente mensurado em segundos (* p<0,05 SHR<SLA16). **(B) Tempo de *grooming***: Comportamento de autolimpeza mensurado em segundos (* p<0,05 SHR>SLA16; # p<0.05 FEN>VEH). **(C) *Grooming***: Número de comportamento de autolimpeza realizados (* p<0,05 SHR>SLA16; # p<0.05 FEN>VEH). **(D) Latência: *grooming***: Tempo em segundos para iniciar o comportamento de autolimpeza (* p<0,05 SHR<SLA16; # p<0.05 FEN<VEH). Os resultados foram expressos em média ± EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

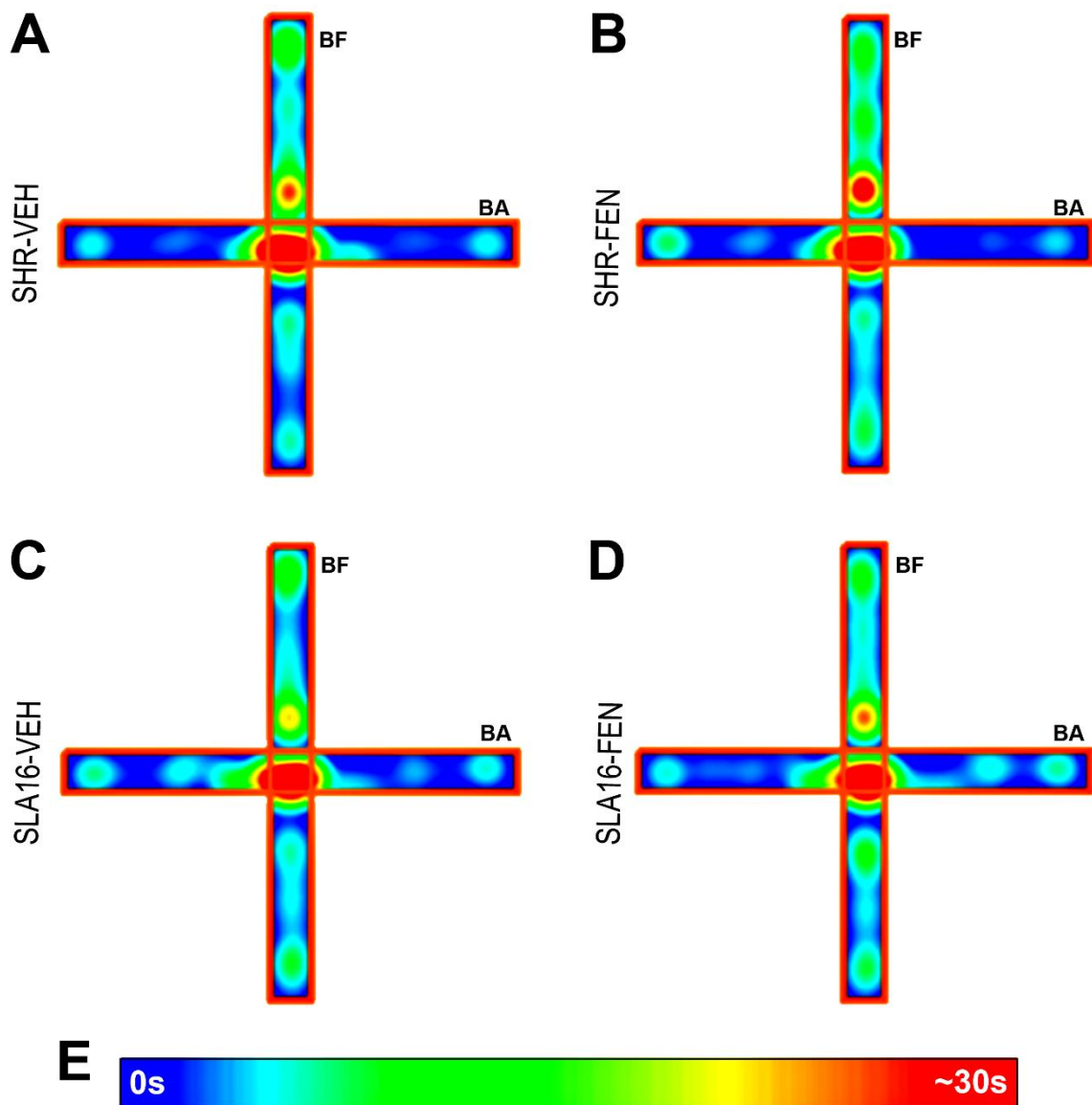
4.1.2.3 Influência do FEN no teste de LCE: grupos de repetidas doses

Aos 61 dias de idade, após o teste do CA, os animais receberam FEN ou VEH, para então aos 62 dias de idade (22±1h após administração) serem testados no LCE. No LCE (Tabela 1 e Figura 24), a administração de doses repetidas de FEN aumentou a distância total percorrida [$F(1,28)=7,81$; $p=0,01$], o número de entradas nos braços aberto [$F(1,26)=10,31$; $p=0,01$] e fechado [$F(1,28)=4,62$; $p=0,04$] em relação aos grupos tratados com VEH. Não houve diferença entre os tratamentos, em relação ao

tempo e percentual de entradas e de tempo nos braços abertos e fechados. Nenhuma diferença entre as linhagens, ou interação foi significativa.

Estes resultados sugerem que ratas de ambas as linhagens não apresentaram comportamento do tipo ansioso/medo no LCE.

Figura 24 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de LCE



Fonte: O autor. Mapa do tempo de ocupação do grupo analisado no LCE 22±1h após a administração de doses repetidas de FEN (4 mg/kg) e/ou VEH. A plotagem demonstra a ocupação no LCE por 5min nos braços abertos (BA) e fechados (BF). **(A) SHR-VEH:** plotagem de ocupação do rato SHR 22±1h após a administração de VEH. **(B) SHR-FEN:** plotagem de ocupação do rato SHR 22±1h após a administração de FEN. **(C) SLA16-VEH:** plotagem de ocupação do rato SLA16 22±1h após a administração de VEH. **(D) SLA16-FEN:** plotagem de ocupação do rato SLA16 22±1h após a administração de FEN. **(E) Escala:** escala equivalente a plotagem de ocupação, tendo intervalo de 0 (cor azul) a 30 segundos (cor vermelha).

Tabela 1 - Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no aparato de LCE

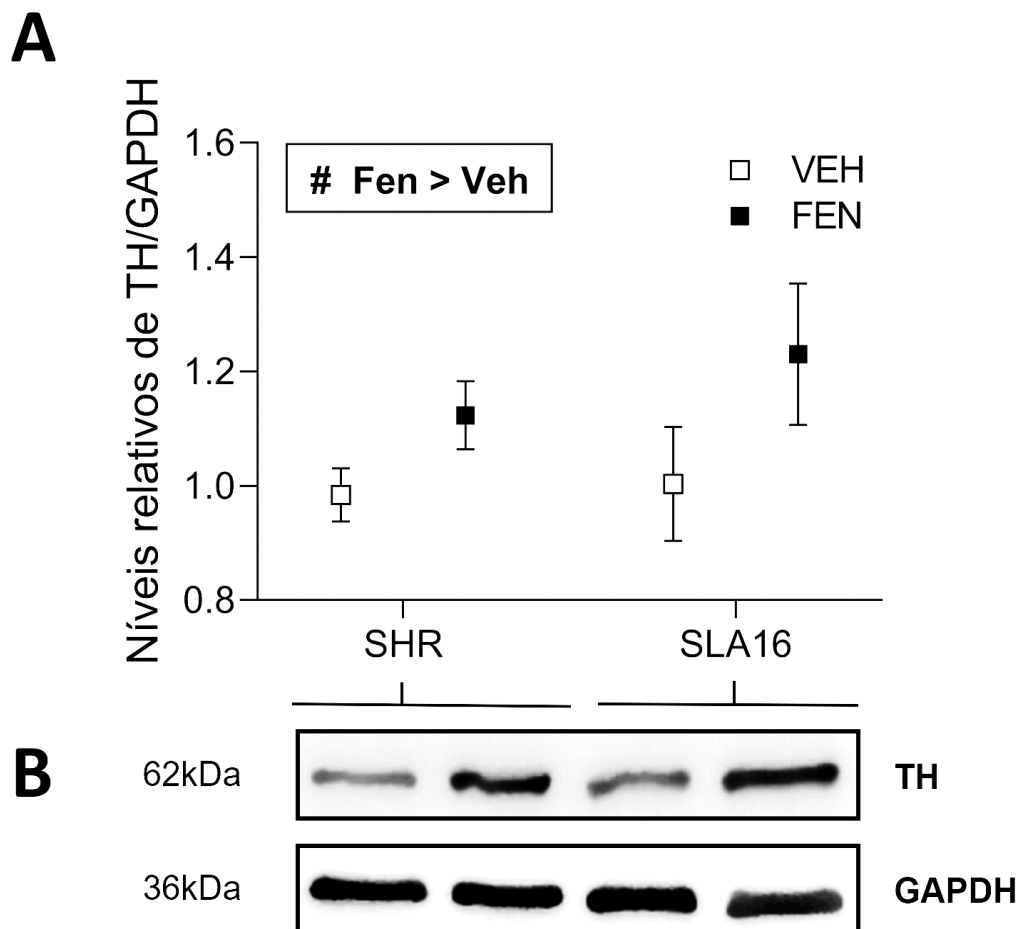
	SHR		SLA16		ANOVA dois fatores		
	VEH	FEN	VEH	FEN	Linhagem	Tratamento	Interação
Distância total (m)	18,0±0,8	15,6±0,5	19,0±0,8	16,9±0,9	F(1,28)=2,09	F(1,28)=7,81*	F(1,28)=0,02
Entradas no BA (n)	18,1±1,4	15,1±2,0	18,6±0,5	12,6±0,8	F(1,26)=0,56	F(1,26)=10,31*	F(1,26)=1,14
Entradas no BF (n)	21,5±1,3	17,0±1,1	19,6±1,9	17,5±1,8	F(1,28)=0,19	F(1,28)=4,62*	F(1,28)=0,59
Tempo no BA (seg)	82,8±10,6	72,7±8,4	90,5±4,4	90,0±11,4	F(1,28)=1,86	F(1,28)=0,33	F(1,28)=0,27
Tempo no BF (seg)	124,2±10,9	136,9±8,2	116,2±3,6	121,5±8,0	F(1,28)=2,08	F(1,28)=1,23	F(1,28)=0,20
% entradas no BA	45,7±2,7	46,0±4,2	44,6±6,6	37,9±6,3	F(1,28)=0,31	F(1,28)=0,79	F(1,28)=1,00
% entradas no BF	54,3±2,7	54,0±4,2	55,4±6,6	62,1±6,3	F(1,28)=0,31	F(1,28)=0,79	F(1,28)=1,00
% tempo no BA	40,1±5,3	34,6±3,9	43,7±1,9	41,9±4,4	F(1,28)=1,84	F(1,28)=0,78	F(1,28)=0,20
% tempo no BF	59,9±5,3	65,4±3,9	56,3±1,9	58,1±4,4	F(1,28)=1,84	F(1,28)=0,78	F(1,28)=0,20

Fonte: O autor. Ratos fêmeas SHR e SLA16 tratados com doses repetidas de FEN (4 mg/kg, i.p.) ou VEH, e avaliados no teste de LCE 22±1h após a última administração. O teste avaliou a distância total e parâmetros de exploração dos braços abertos (BA) e fechados (BF) por 5 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM (* p<0.05 FEN > VEH) com 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

4.1.2.4 TH, DRD1 e DRD2 do NAc: grupos de repetidas doses de FEN e VEH

Aos 63 dias de idade dos animais o NAc das ratas das linhagens SHR e SLA16 foi coletado para a quantificação por *Western blotting* das proteínas TH, DRD1 e DRD2 dos grupos FEN e VEH (22±1h após a última administração de FEN). Após a aplicação de uma ANOVA de dois fatores observou-se que os níveis relativos da proteína TH são maiores nos grupos FEN do que no grupo VEH [$F(1,28)=4,30$; $p=0,04$] (Figura 25). Não houve interação ou diferença entre linhagens SHR e SLA16 em relação a TH.

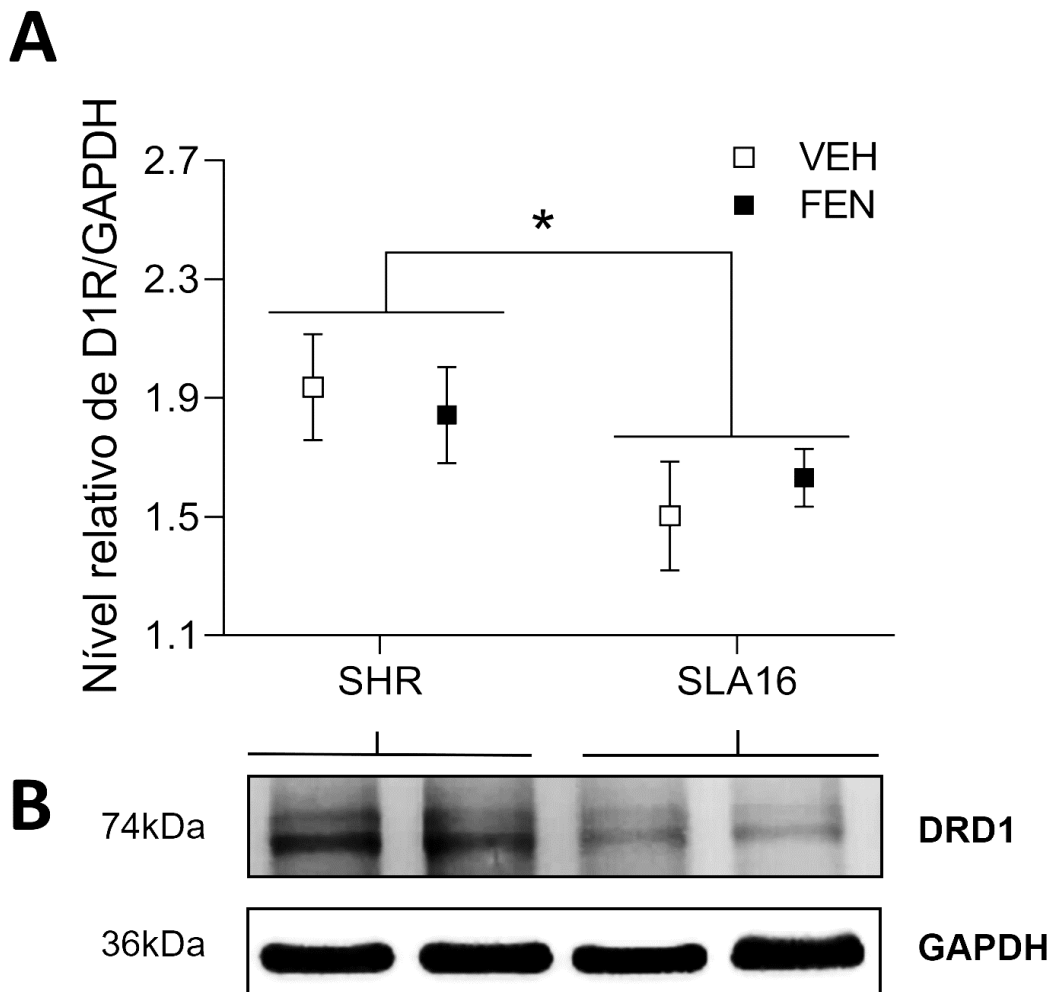
Figura 25 – Quantificação dos níveis de TH de fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN



Fonte: O autor. Quantificação dos níveis de proteína tirosina hidroxilase (TH) no NAc dos grupos FEN e VEH das linhagens SHR e SLA16. (A) Quantificação dos níveis de TH obtidos para cada tratamento e linhagem, normalizando em relação aos níveis de GAPDH. (B) Imagem representativa das bandas de TH obtidas em amostras do NAc utilizando a proteína GAPDH como controle de carregamento. Os resultados foram expressos em média ± EPM (# $p<0,05$ VEH < FEN) com 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Em relação aos níveis relativos quantificados de DRD1, a aplicação de testes ANOVA de dois fatores demonstrou que a linhagem SHR apresentou maior quantidade dessa proteína na região do NAc do que a linhagem SLA16 [F(1,26)=4,18; p=0,05] (Figura 26). Não houve interação ou diferença entre tratamentos em relação a DRD1.

Figura 26 – Quantificação dos níveis de DRD1 de fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN

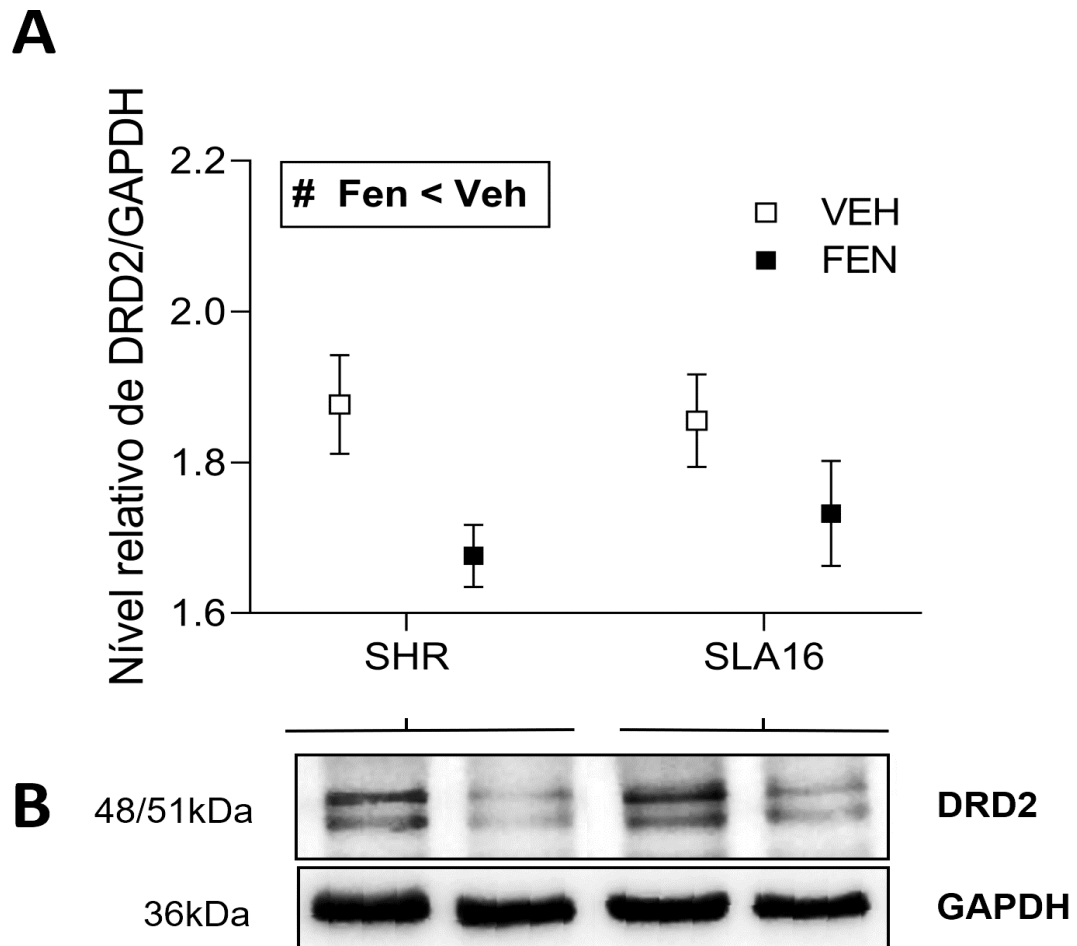


Fonte: O autor. Quantificação dos níveis de proteína receptor dopaminérgico do tipo 1 (DRD1) no NAc dos grupos FEN e VEH das linhagens SHR e SLA16. (A) Quantificação dos níveis de DRD1 obtidos para cada tratamento e linhagem, normalizando em relação aos níveis de GAPDH. (B) Imagem representativa das bandas de DRD1 obtidas em amostras do NAc utilizando a proteína GAPDH como controle de carregamento. Os resultados foram expressos em média ± EPM (# p<0.05 VEH > FEN) com 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Ao aplicar teste ANOVA de dois fatores observou-se que os níveis relativos quantificados de DRD2 foram maiores nos grupos FEN e *naïve* do que no grupo VEH [$F(1,28)=7,19$; $p=0,01$] (Figura 27), bem como não houve interação ou diferença entre linhagens SHR e SLA16 em relação aos níveis de proteína DRD2 no NAc.

Estes resultados sugerem que as ratas de ambas as linhagens estavam sob um estímulo tônico de ação do FEN (TH e DRD2) e que não havia estímulo fásico (DRD1), mas que há uma diferença basal na quantidade de receptores DRD1 entre as linhagens.

Figura 27 – Quantificação dos níveis de DRD2 de fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN



Fonte: O autor. Quantificação dos níveis de proteína receptor dopaminérgico do tipo 2 (DRD2) no NAc dos grupos FEN e VEH das linhagens SHR e SLA16. (A) Quantificação dos níveis de DRD2 obtidos para cada tratamento e linhagem, normalizando em relação aos níveis de GAPDH. (B) Imagem representativa das bandas de DRD2 obtidas em amostras do NAc utilizando a proteína GAPDH como controle de carregamento. Os resultados foram expressos em média \pm EPM (# $p<0.05$ VEH > FEN) com 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

4.2 SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL

4.2.1 Experimento 3: Administração de dose única de FEN 22±1h antes

Em razão dos resultados observados na administração de doses repetidas de FEN no experimento 2, no qual os animais foram testados ao CA e LCE 22±1h após a última administração outros dois experimentos foram delineados e executados: a) o experimento 3, onde houve a administração de dose única de FEN (4 mg/kg, i.p.) 22±1h antes dos testes de CA e LCE; e b) o experimento 4, no qual houve administração de dose única de FEN (4 mg/kg, i.p.) 15 min antes dos testes de CA e LCE.

4.2.1.1 Influência do FEN no CA: grupos tratados com dose única 22±1h antes

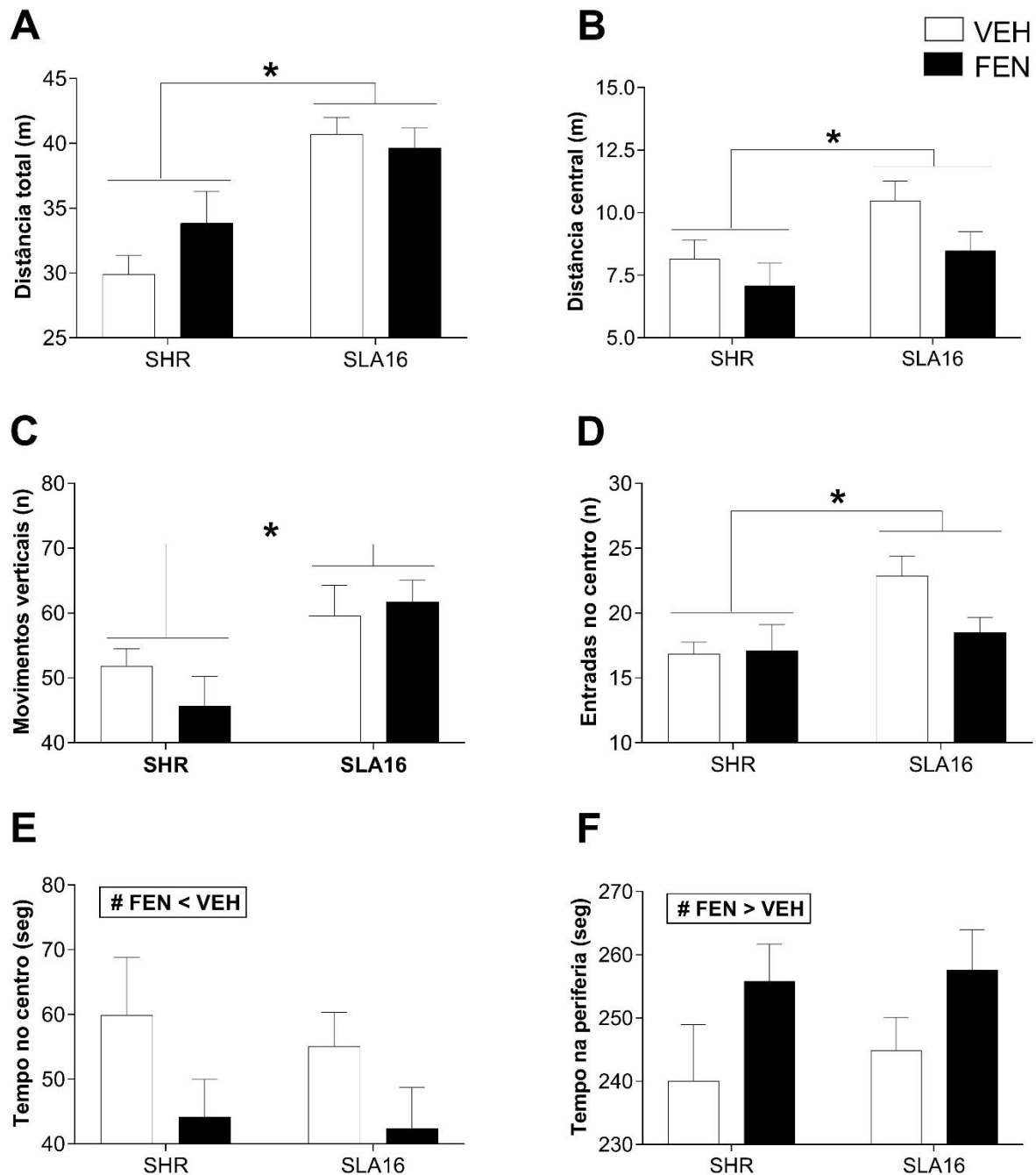
O teste de CA foi realizado aos 61 dias de idade dos animais das linhagens SHR e SLA16 22±1h após a administração de dose única de FEN. Testes ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan demonstraram que administração de FEN diminuiu o tempo de permanência na área central [F(1,28)=4,49; p=0,04] (Figura 28E), aumentou o tempo [F(1,28)=4,49; p=0,04] (Figura 28F) e a distância percorrida na área periférica [F(1,28)=4,53; p=0,04] (Figura 29B). Nenhuma diferença entre os tratamentos foi observada em relação: a distância total [F(1,28)=0,70; p=0,40] (Figura 28A), às entradas no centro [F(1,28)=2,00; p=0,16] (Figura 28D), aos movimentos verticais [F(1,28)=0,26; p=0,61] (Figura 28C), ao tempo médio por visita ao centro [F(1,28)=1,64; p=0,21] (Figura 30A), aos movimentos de *rearing* [F(1,27)=1,53; p=0,22] (Anexo B), aos movimentos de *climbing* [F(1,28)=0,16; p=0,68] (Anexo B), a velocidade máxima [F(1,28)=0,88; p=0,35] (Figura 29A), ao tempo de *sniffing* [F(1,28)=1,63; p=0,21] (Figura 31A) e *grooming*, considerando número [F(1,28)=3,24; p=0,72] (Figura 31C), latência [F(1,27)=2,36; p=0,13] (Figura 31D) e tempo [F(1,28)=2,16; p=0,15] (Figura 31B). Nos grupos tratados com FEN observou-se uma tendência de diminuição da distância percorrida na área central [F(1,28)=3,66; p=0,06] (Figura 28B), bem como uma tendência de aumento no tempo médio por visita à periferia [F(1,28)=2,94; p=0,09] (Figura 30B).

Com relação às linhagens, ANOVAs de dois fatores demonstraram que a linhagem SLA16 apresentou os seguintes parâmetros aumentados em relação a

linhagem SHR: distância total [F(1,28)=22,81; p=0,01] (Figura 28A), distância central [F(1,28)=5,35; p=0,02] (Figura 28B), movimentos verticais [F(1,28)=9,36; p=0,04] (Figura 28C), entradas no centro do aparato [F(1,28)=6,41; p=0,01] (Figura 28D), distância periférica percorrida [F(1,28)=20,95; p=0,01] (Figura 29B), velocidade máxima [F(1,28)=12,94; p=0,01] (Figura 29A), tempo de *sniffing* [F(1,28)=28,20; p=0,01] (Figura 31A) e quantidade de *rearing* [F(1,27)=16,32; p=0,01] (Anexo B). Um maior tempo médio de permanência nas visitas ao centro foi apresentado pela linhagem SHR.

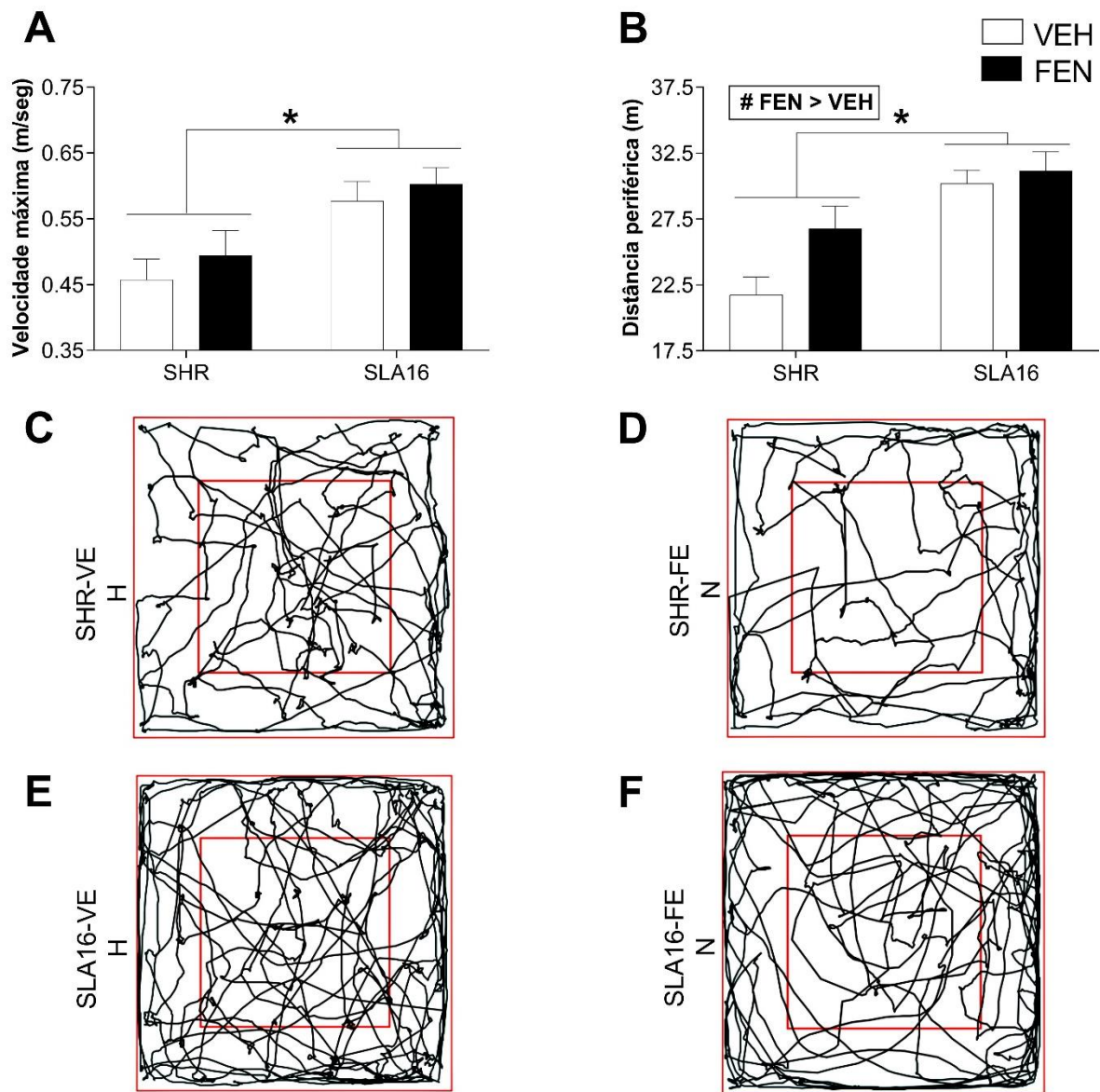
Não houve diferenças entre tratamentos ou entre linhagens quanto a quantidade de defecções realizadas nesse teste de CA realizado em um tempo de 5min (Dados complementares – Anexo B).

Figura 28 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de CA (Dados 1)



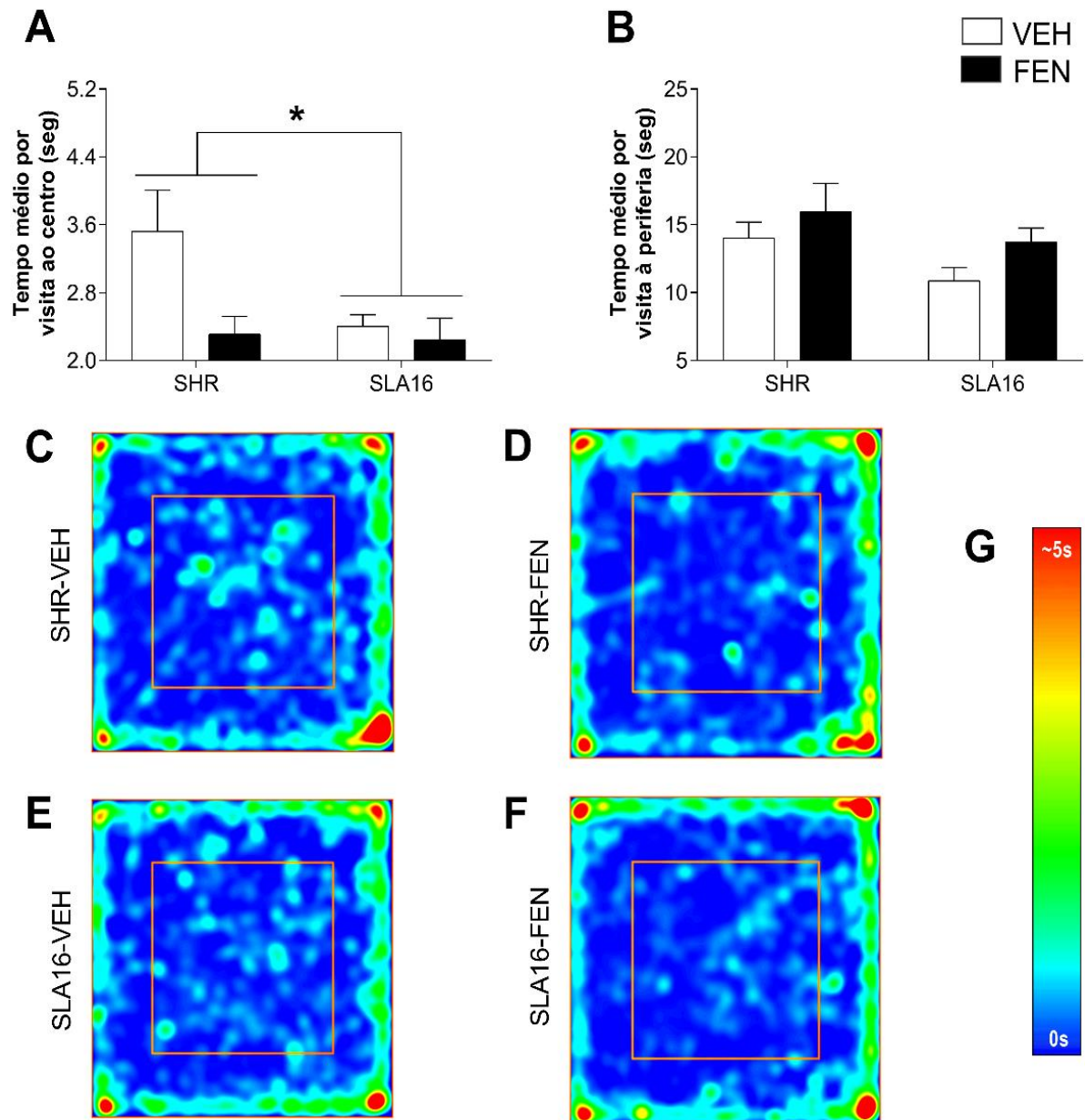
Fonte: O autor. O efeito da administração de dose única de FEN (4 mg/kg) ou VEH sobre o comportamento no CA durante 5min. O teste de campo aberto foi realizado 22±1h após a administração de dose única de FEN ou VEH. **(A) Distância total:** distância percorrida em metros (* p<0.05 SLA16>SHR). **(B) Distância central:** distância percorrida em metros na área central (* p<0.05 SLA16>SHR). **(C) Movimento verticais:** número de movimentos totais de elevações sobre duas patas (* p<0.05 SLA16>SHR). **(D) Entradas no centro:** número de entradas na área central (* p<0.05 SLA16>SHR). **(E) Tempo no centro:** tempo gasto na área central do aparato (# p<0.05 FEN<VEH). **(F) Tempo na periferia:** tempo gasto na área periférica do aparato (# p<0.05 FEN>VEH). Os resultados foram expressos em média ± EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Figura 29 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de CA (Dados 2)



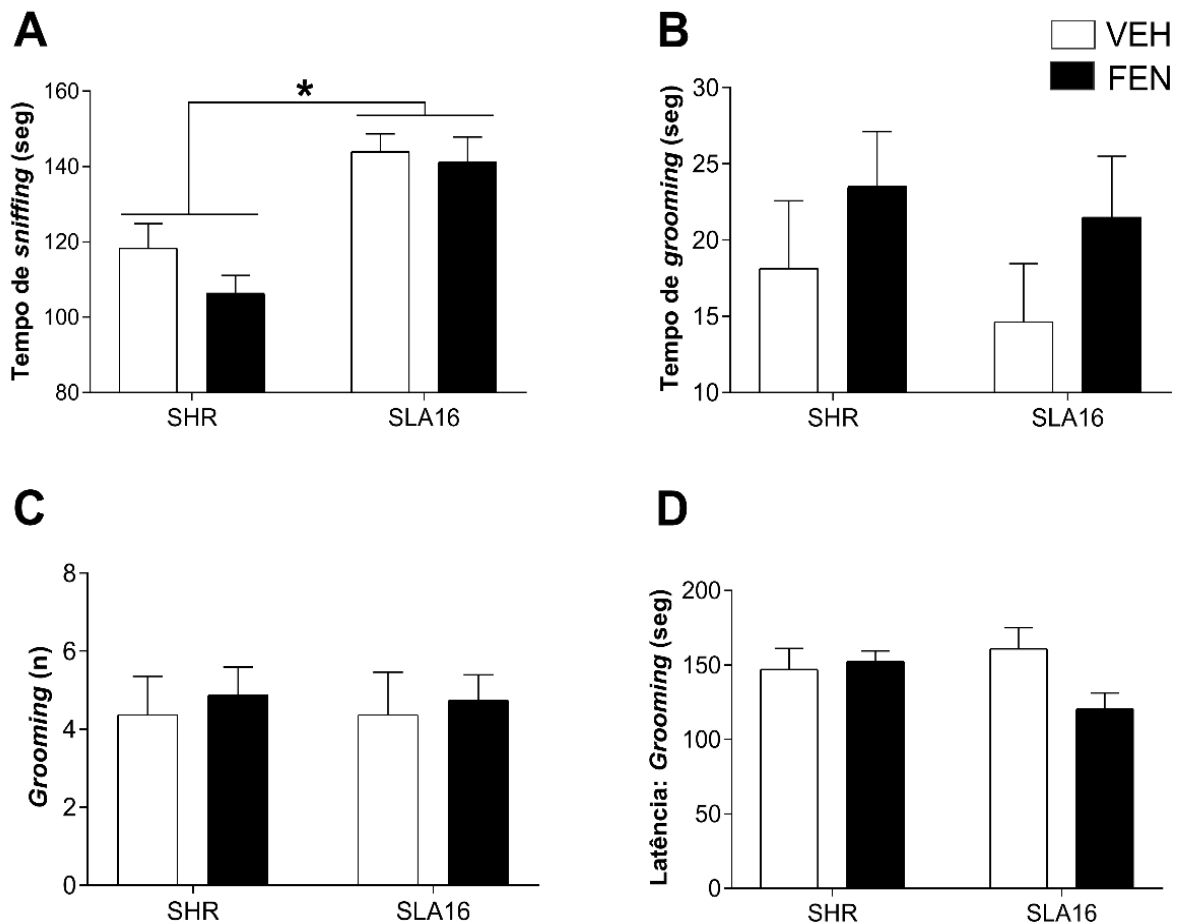
Fonte: O autor. O efeito da administração de dose única de FEN (4 mg/kg) ou VEH sobre o comportamento no CA durante 5min. O teste de campo aberto foi realizado 22±1h após a administração de dose única de FEN ou VEH. **(A) Velocidade máxima:** velocidade média realizada em centímetros por segundo (* $p < 0,05$ SHR < SLA16). **(B) Distância periférica:** distância percorrida em metros na área periférica (* $p < 0,05$ SHR < SLA16; # $p < 0,05$ FEN > VEH). **(C) SHR-VEH:** movimento padrão do rato SHR 22±1h após a administração de VEH. **(D) SHR-FEN:** movimento padrão do rato SHR 22±1h após a administração de FEN. **(E) SLA16-VEH:** movimento padrão do rato SLA16 22±1h após a administração de VEH. **(F) SLA16-FEN:** movimento padrão do rato SLA16 22±1h após a administração de FEN. Os resultados foram expressos em média ± EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Figura 30 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de CA (Dados 3)



Fonte: O autor. O efeito da administração de dose única de FEN (4 mg/kg) ou VEH sobre tempo médio de duração de cada visita e tempo de permanência no CA durante 5min. O teste de campo aberto foi realizado 22±1h após a administração de dose única de FEN ou VEH. **(A) Tempo médio por visita ao centro:** quantidade média de segundos de permanência na região central do aparato (* $p < 0,05$ SHR>SLA16). **(B) Tempo médio por visita à periferia:** quantidade média de segundos de permanência na região periférica do aparato. **(C) SHR-VEH:** plotagem de ocupação do rato SHR 22±1h após a administração de VEH. **(D) SHR-FEN:** plotagem de ocupação do rato SHR 22±1h após a administração de FEN. **(E) SLA16-VEH:** plotagem de ocupação do rato SLA16 22±1h após a administração de VEH. **(F) SLA16-FEN:** plotagem de ocupação do rato SLA16 22±1h após a administração de FEN. **(G) Escala:** escala equivalente a plotagem de ocupação, tendo intervalo de 0 (cor azul) a 5 segundos (cor vermelha). Os resultados foram expressos em média ± EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Figura 31 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de CA (Dados 4)

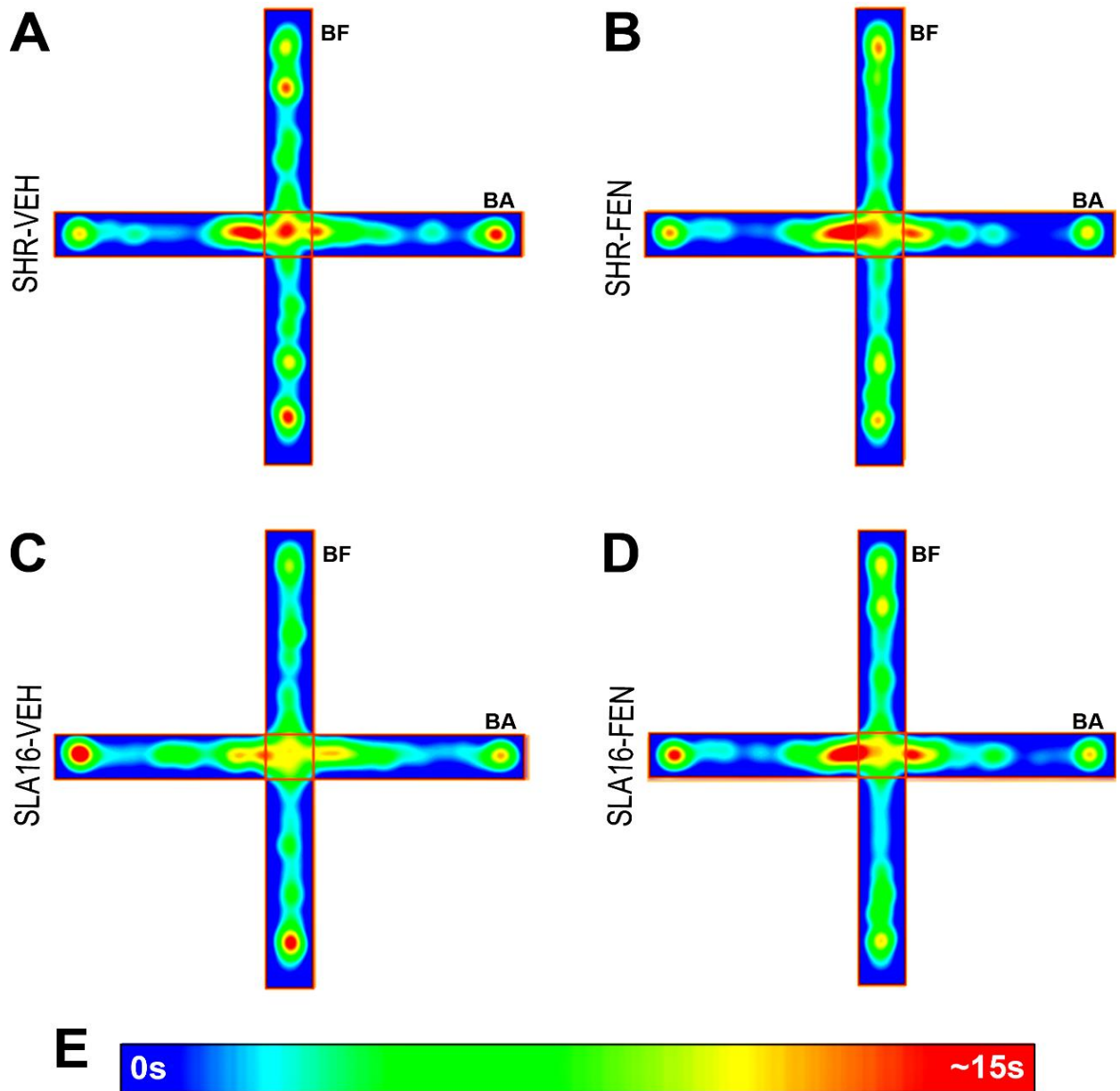


Fonte: O autor. O efeito da administração de dose única de FEN (4 mg/kg) ou VEH sobre o comportamento no CA durante 5min. O teste de campo aberto foi realizado 22±1h após a administração de dose única de FEN ou VEH. **(A) Tempo de sniffing:** Comportamento de farejar o ambiente mensurado em segundos (* $p < 0,05$ SHR < SLA16). **(B) Tempo de grooming:** Comportamento de autolimpeza mensurado em segundos. **(C) Grooming:** Número de comportamento de autolimpeza realizados. **(D) Latência: grooming:** Tempo em segundos para iniciar o comportamento de autolimpeza. Os resultados foram expressos em média ± EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

4.2.1.2 Influência do FEN no LCE: grupos tratados com dose única 22±1h antes

No LCE (Tabela 2 e Figura 32), uma diferença foi observada entre as linhagens no parâmetro de distância total percorrida, onde a locomoção no aparato pela linhagem SLA16 foi maior do que pela linhagem SHR [$F(1,28)=5,16$; $p=0,03$]. Conforme discriminado na tabela R2 não houve diferenças entre linhagens e após o tratamento com dose única de FEN nos demais parâmetros analisados: entradas no braço aberto, entradas no braço fechado, tempo no braço aberto, tempo no braço fechado e percentuais de entradas e tempo em ambos os braços do LCE.

Figura 32 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de LCE



Fonte: O autor. Mapa de calor da ocupação do tempo médio de ocupação do grupo analisado no LCE 22±1h após a administração de dose única de FEN (4 mg/kg) e/ou VEH. A plotagem demonstra a ocupação no LCE por 5min nos braços abertos (BA) e fechados (BF). **(A) SHR-VEH:** plotagem de ocupação do rato SHR 22±1h após a administração de VEH. **(B) SHR-FEN:** plotagem de ocupação do rato SHR 22±1h após a administração de FEN. **(C) SLA16-VEH:** plotagem de ocupação do rato SLA16 22±1h após a administração de VEH. **(D) SLA16-FEN:** plotagem de ocupação do rato SLA16 22±1h após a administração de FEN. **(E) Escala:** escala equivalente a plotagem de ocupação, tendo intervalo de 0 (cor azul) a 15 segundos (cor vermelha).

Tabela 2 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 22±1h antes do teste no aparato de LCE

	SHR		SLA16		ANOVA dois fatores		
	VEH	FEN	VEH	FEN	Linhagem	Tratamento	Interação
Distância total (m)	10,2±0,3	10,8±0,5	12,5±1,0	11,7±0,6	F(1,27)= 5,16*	F(1,27)= 0,03	F(1,27)=1,05
Entradas no BA (n)	13,1±1,3	14,9±1,2	15,4±0,7	15,0±1,0	F(1,28)= 1,21	F(1,28)= 0,40	F(1,28)=0,97
Entradas no BF (n)	9,1±0,6	10,0±0,9	10,8±1,6	10,1±1,1	F(1,27)= 0,57	F(1,27)= 0,01	F(1,27)=0,42
Tempo no BA (seg)	133,2±9,8	131,0±15,0	150,4±14,6	144,7±10,7	F(1,28)= 1,46	F(1,28)= 0,09	F(1,28)=0,01
Tempo no BF (seg)	123,8±11,1	121,8±14,2	103,4±10,6	111,1±11,0	F(1,28)= 1,73	F(1,28)= 0,05	F(1,28)=0,16
% entradas no BA	56,2±2,5	59,8±3,3	60,1±3,5	59,9±3,7	F(1,28)= 0,39	F(1,28)= 0,28	F(1,28)= 0,33
% entradas no BF	43,8±2,5	40,2±3,3	39,9±3,5	40,1±3,7	F(1,28)= 0,39	F(1,28)= 0,28	F(1,28)= 0,33
% tempo no BA	51,9±4,0	51,7±5,7	58,7±4,5	56,6±4,2	F(1,28)= 1,56	F(1,28)= 0,06	F(1,28)= 0,04
% tempo no BF	48,1±4,0	48,3±5,7	41,3±4,5	43,4±4,2	F(1,28)= 1,56	F(1,28)= 0,06	F(1,28)= 0,04

Fonte: O autor. Ratos fêmeas SHR e SLA16 tratados com dose única de FEN (4 mg/kg, i.p.) ou VEH avaliados no teste de LCE 22±1h após a administração. O teste avaliou a distância total e parâmetros de exploração dos braços aberto (BA) e fechado (BF) por 5 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM (* p<0.05 FEN < VEH) com 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

4.2.2 Experimento 4: Administração de dose única de FEN 15min antes

Nesse experimento, ratas da linhagem SHR e SLA16 foram testadas no CA e LCE 15min após a administração de FEN ou VEH.

4.2.2.1 Influência do FEN no CA: grupos tratados com dose única 15min antes

O teste de CA foi realizado aos 61 dias de idade dos animais após 15 min da administração de uma dose de FEN (4 mg/kg) ou VEH. Testes ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan demonstraram que a administração de FEN aumentou o tempo de permanência no centro [F(1,27)=4,99; p=0,03] (Figura 33E), diminuiu o tempo periférico [F(1,27)=4,99; p=0,03] (Figura 33F), diminuiu o tempo de *sniffing* [F(1,28)=4,68; p=0,03] (Figura R20A), diminuiu a latência do *grooming* [F(1,27)=61,35; p=0,01] (Figura 36D), aumentou a quantidade [F(1,27)=142,97; p=0,01] (Figura 36C) e o tempo de *grooming* [F(1,27)=29,48; p=0,01] (Figura 36B). Nenhuma diferença de tratamento foi observada para a distância central percorrida [F(1,28)=0,01; p=0,94] (Figura 33B).

Em relação às linhagens, os ratos SLA16 realizaram um maior número de *rearings* [F(1,27)=6,52; p=0,01] (Anexo C) do que os ratos SHR. O tempo de comportamento de *sniffing* foi maior na linhagem SLA16 do que na SHR

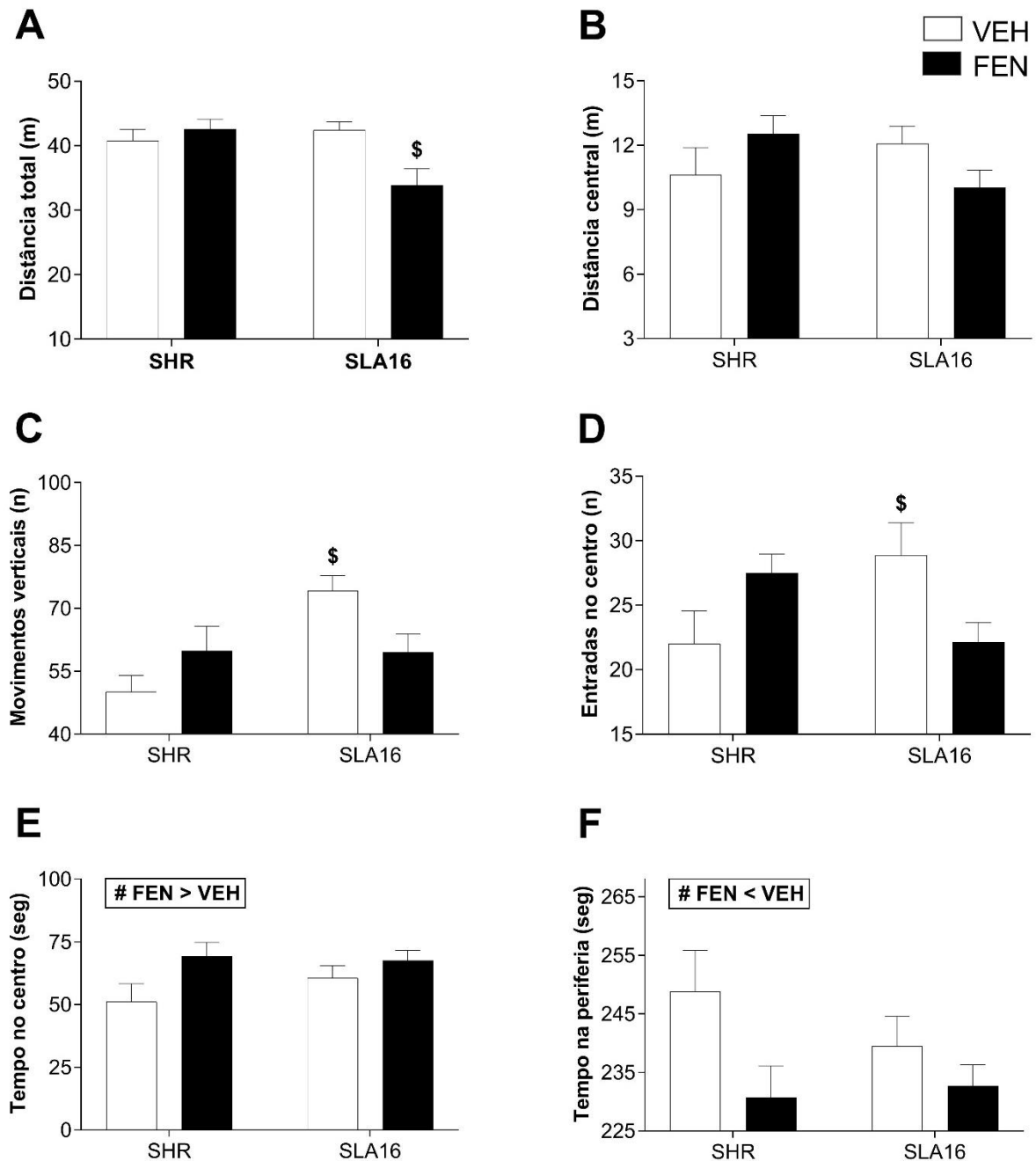
[F(1,28)=45,61; p=0,01] (Figura 36A). A quantidade de movimentos verticais demonstrou diferenças entre as linhagens (Figura 36C), entretanto nesse parâmetro interações foram observadas.

Interações foram observadas (ANOVA de dois fatores), nas quais o grupo SLA16-FEN foi menor do que os demais grupos em relação a: distância total percorrida [F(1,27)=7,75; p=0,01] (Figura 33A), velocidade máxima [F(1,27)=10,44; p=0,03] (Figura 34A), distância periféricas percorridas [F(1,27)=4,34; p=0,04] (Figura 34B) e quantidade de movimento de *climbing* [F(1,27)=9,86; p=0,01] (Anexo C). O tempo médio de permanência por visita no centro [F(1,27)=4,34; p=0,04] (Figura R19A) do grupo SLA16-FEN foi maior do que os demais grupos. Em relação às interações, ainda pode ser observado que o grupo SLA16-VEH apresentou em relação aos demais grupos aumento de movimentos verticais realizados [F(1,28)=7,34; p=0,01] (Figura 33C) e aumento de comportamentos de *climbing* [F(1,27)=9,86; p=0,01] (Anexo C). Ainda SLA16-VEH apresentou aumento de entradas no centro [F(1,28)=8,68; p=0,01] (Figura 33D) em relação aos grupos SHR-VEH e SLA16-VEH, bem como o tempo médio de permanência por visita na região periférica do grupo SHR-VEH foi maior do que o dos grupos SHR-FEN e SLA16-VEH [F(1,27)=4,85; p=0,03] (Figura 35B).

Não houve diferenças entre tratamentos ou entre linhagens quanto a quantidade de defecações realizadas nesse teste de CA realizado em um tempo de 5min (Dados complementares – Anexo C).

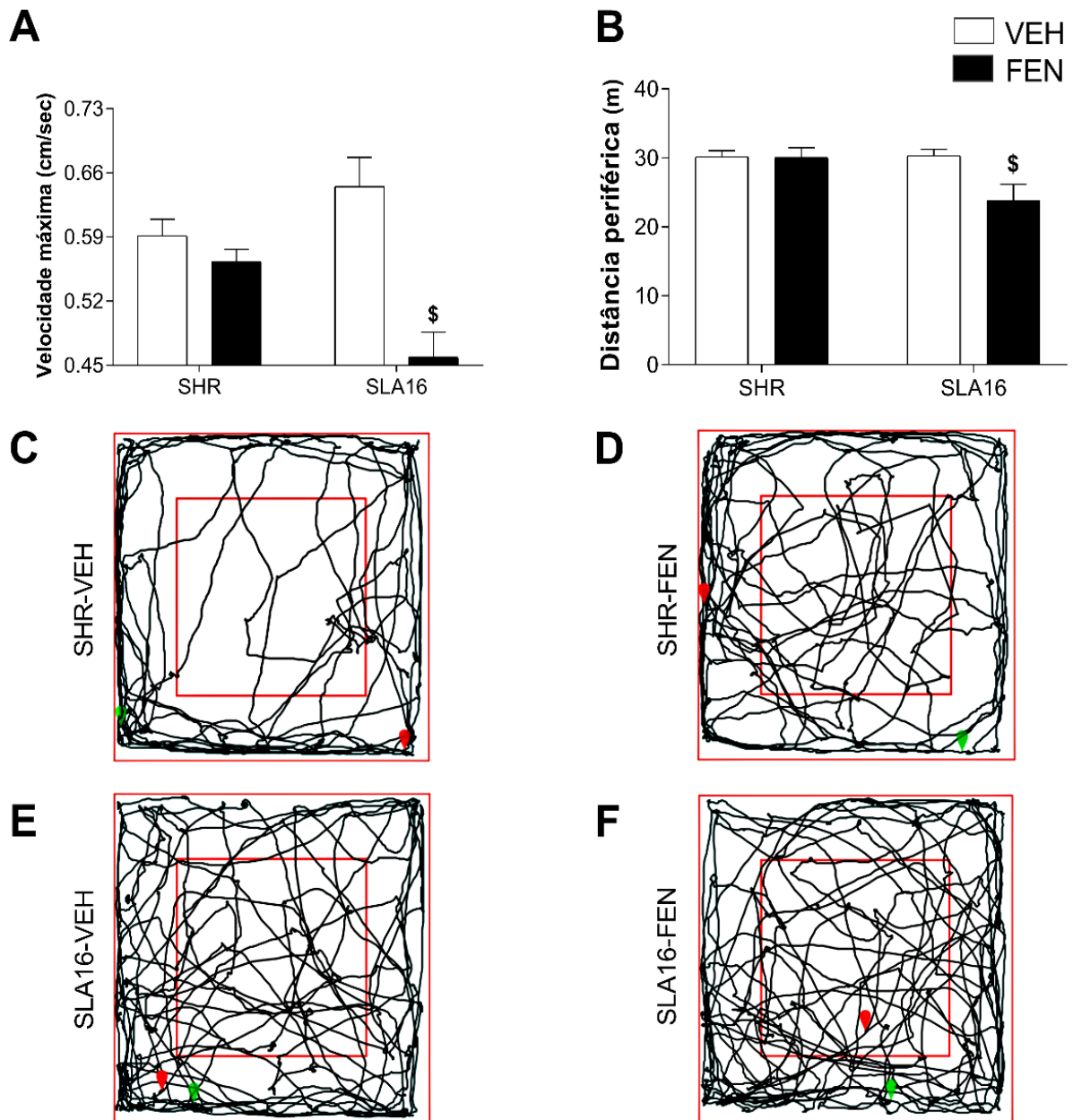
Estes resultados sugerem que ratas SLA16 e SHR apresentam comportamento de emocionalidade distinto 15min após a administração de FEN e que o FEN diminuiu o comportamento de movimento de ratas da linhagem SLA16 no CA, mas não de SHR.

Figura 33 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 15min antes do teste no aparato de CA (Dados 1)



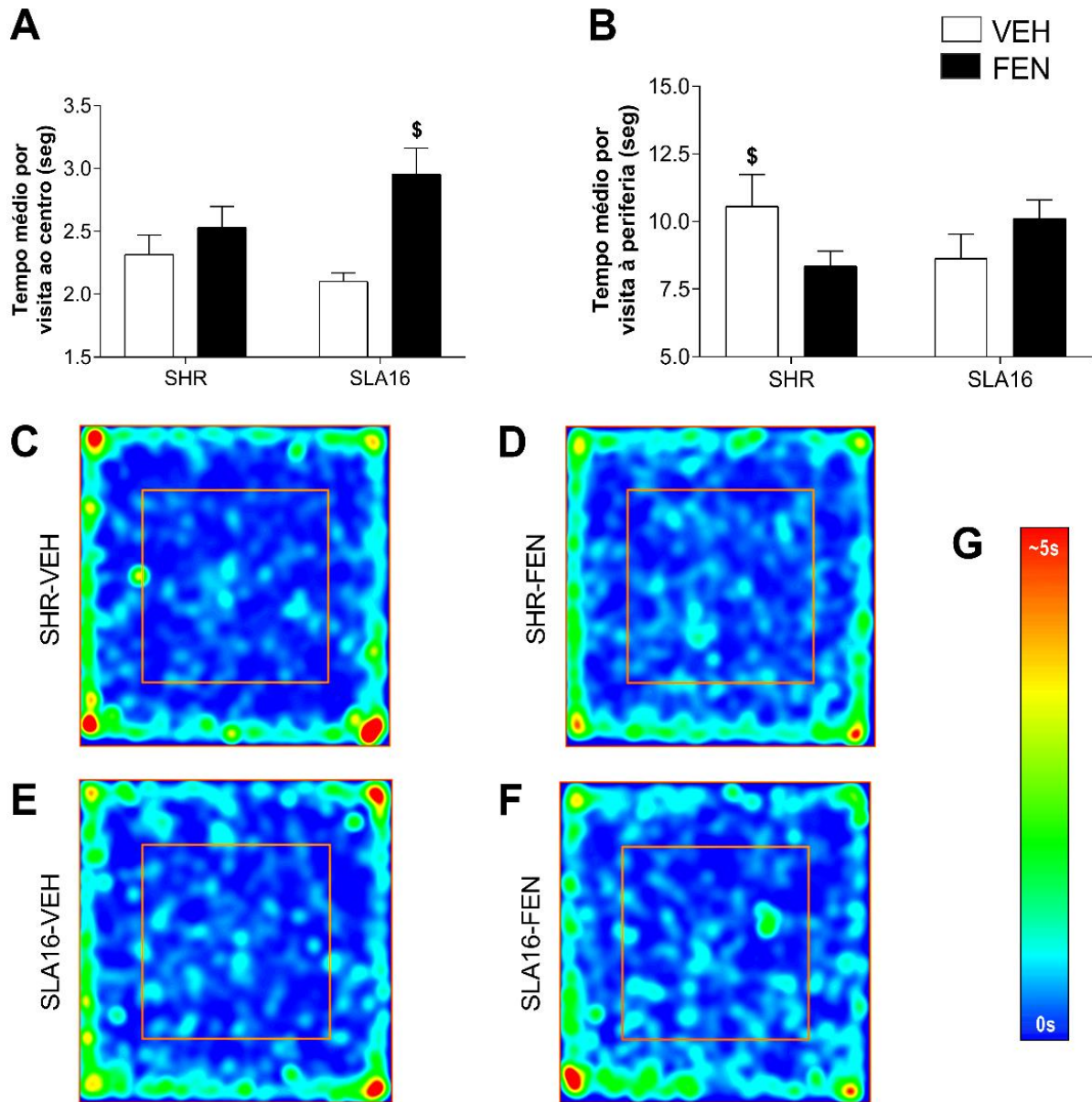
Fonte: O autor. O efeito da administração de doses de FEN (4 mg/kg) ou VEH sobre o comportamento no CA durante 5min. O teste de CA foi realizado 15 min após a administração de dose única de FEN ou VEH. **(A) Distância total:** distância percorrida em metros ($\$ p < 0.05$ SLA16-FEN < todos os grupos). **(B) Distância central:** distância percorrida em metros na área central. **(C) Movimento verticais:** número de movimentos totais de elevações sobre duas patas ($\$ p < 0.05$ SLA16-VEH > todos os grupos). **(D) Entradas no centro:** número de entradas na área central ($\$ p < 0.05$ SLA16-VEH > SHR-VEH/SLA16-VEH). **(E) Tempo no centro:** tempo gasto na área central do aparato ($\# p < 0.05$ FEN > VEH). **(F) Tempo na periferia:** tempo gasto na área periférica do aparato ($\# p < 0.05$ FEN < VEH). Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Figura 34 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 15min antes do teste no aparato de CA (Dados 2)



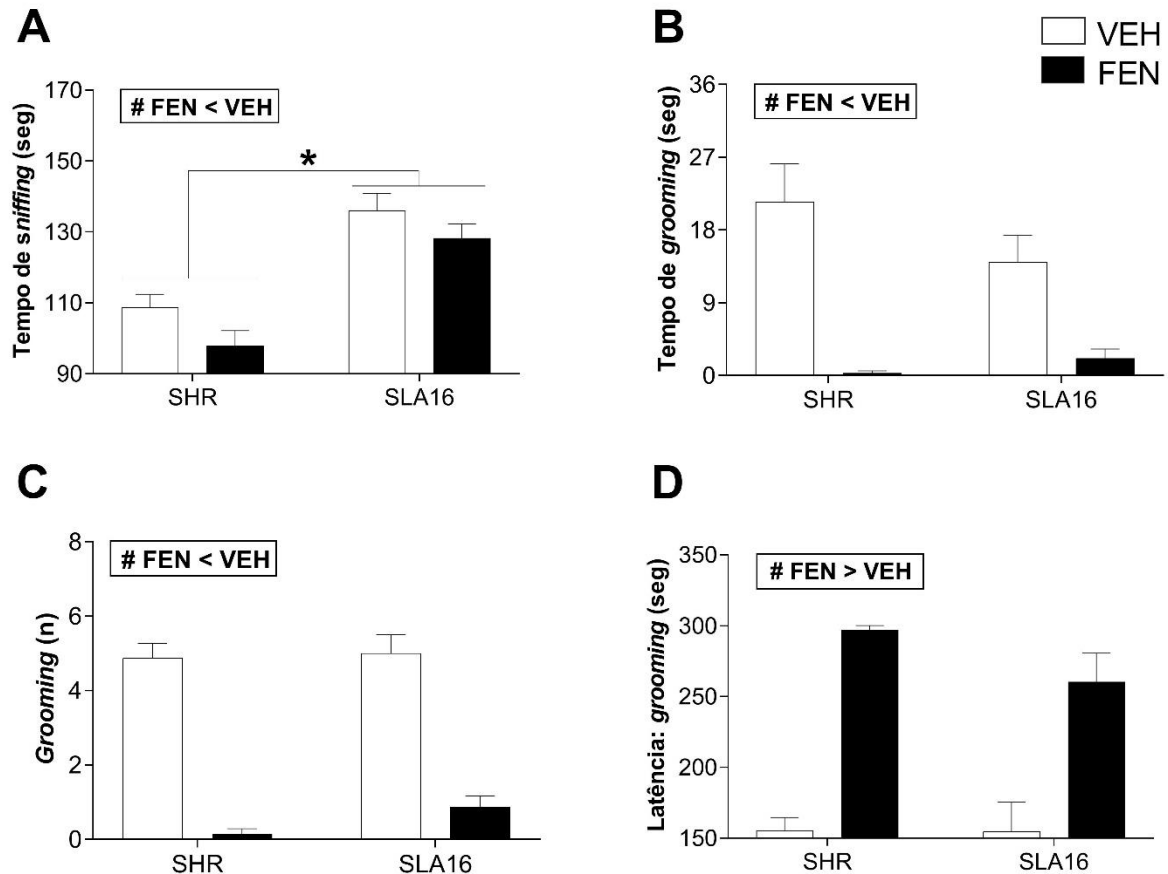
Fonte: O autor. O efeito da administração de dose de FEN (4 mg/kg) ou VEH sobre o comportamento no CA durante 5 min. O teste de CA foi realizado 15min após a administração de dose única de FEN ou VEH. **(A) Velocidade máxima:** velocidade média realizada em centímetros por segundo ($p < 0,05$ SLA16-FEN < todos). **(B) Distância periférica:** distância percorrida em metros na área periférica ($p < 0,05$ SLA16-FEN < todos). **(C) SHR-VEH:** movimento padrão do rato SHR 15 min após a administração de VEH. **(D) SHR-FEN:** movimento padrão do rato SHR 15 min após a administração de FEN. **(E) SLA16-VEH:** movimento padrão do rato SLA16 15 min após a administração de VEH. **(F) SLA16-FEN:** movimento padrão do rato SLA16 15 min após a administração de FEN. Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Figura 35 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 15min antes do teste no aparato de CA (Dados 3)



Fonte: O autor. O efeito da administração de dose de FEN (4 mg/kg) ou VEH sobre tempo médio de duração de cada visita e tempo de permanência no CA durante 5 min. O teste de CA foi realizado 15min após a administração de FEN ou VEH. **(A) Tempo médio por visita ao centro:** quantidade média de segundos de permanência na região central do aparato ($p < 0,05$ SLA16-FEN > todos). **(B) Tempo médio por visita à periferia:** quantidade média de segundos de permanência na região periférica do aparato ($p < 0,05$ SHR-VEH > SHR-FEN/SLA16-VEH). **(C) SHR-VEH:** plotagem de ocupação do rato SHR 15 min após a administração de VEH. **(D) SHR-FEN:** plotagem de ocupação do rato SHR 15 min após a administração de FEN. **(E) SLA16-VEH:** plotagem de ocupação do rato SLA16 15min após a administração de VEH. **(F) SLA16-FEN:** plotagem de ocupação do rato SLA16 15min após a administração de FEN. **(G) Escala:** escala equivalente a plotagem de ocupação, tendo intervalo de 0 (cor azul) a 5 segundos (cor vermelha). Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Figura 36 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 15min antes do teste no aparato de CA (Dados 4)



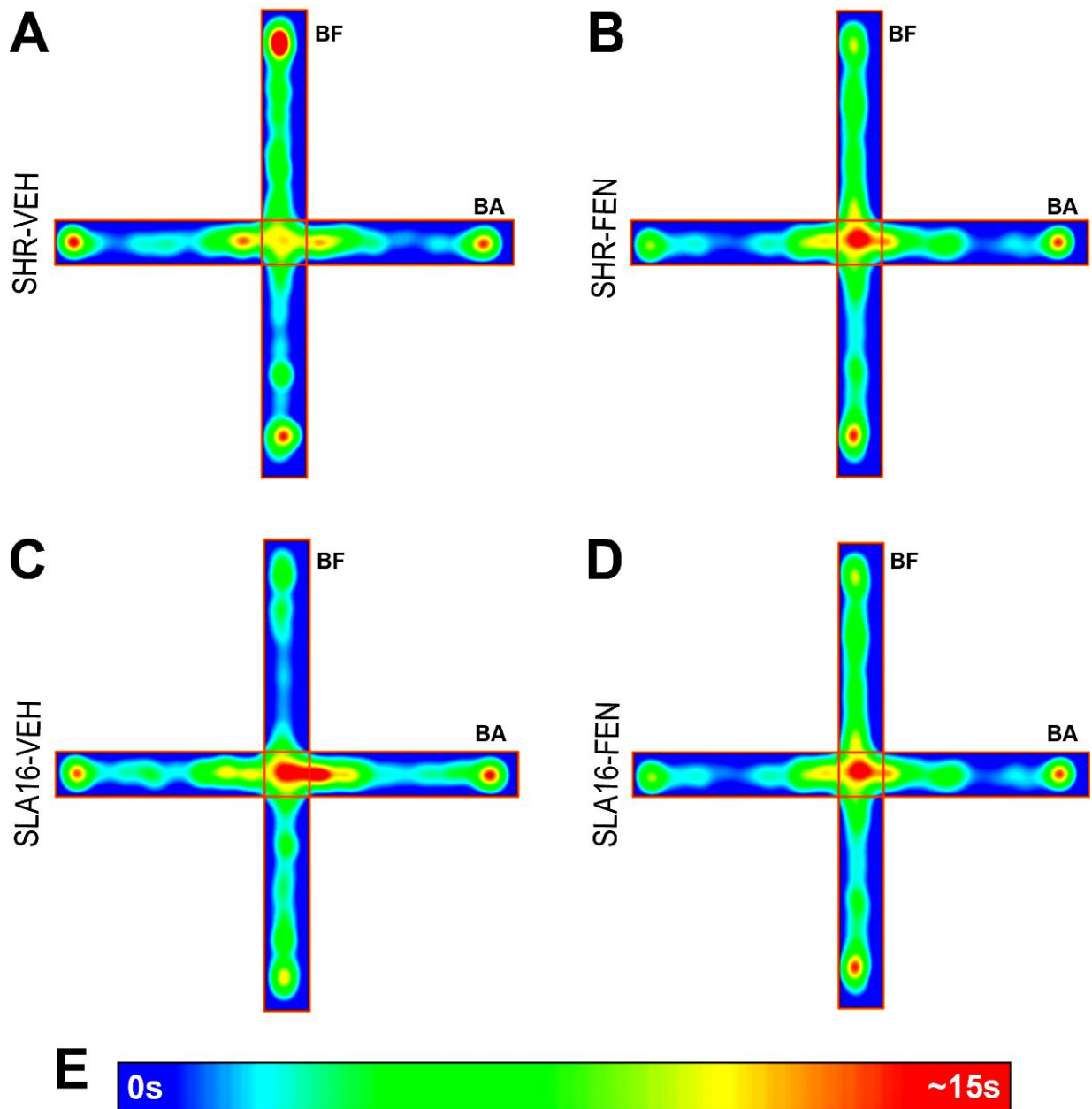
Fonte: O autor. O efeito da administração de dose de FEN (4 mg/kg) ou VEH sobre o comportamento no CA durante 5 min. O teste de CA foi realizado 15min após a administração. **(A) Tempo de sniffing:** Comportamento de farejar o ambiente mensurado em segundos (# $p < 0.05$ FEN < VEH; * $p < 0.05$ SLA16 > SHR). **(B) Tempo de grooming:** Comportamento de autolimpeza mensurado em segundos (# $p < 0.05$ FEN < VEH). **(C) Grooming:** Número de comportamento de autolimpeza realizados (# $p < 0.05$ FEN < VEH). **(D) Latência: grooming:** Tempo em segundos para iniciar o comportamento de autolimpeza (# $p < 0.05$ FEN > VEH). Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

4.2.2.2 Influência do FEN no LCE: grupos tratados com dose única 15min antes

No LCE (Tabela 3 e Figura 37) houve diferença entre as linhagens em relação a distância total percorrida [$F(1,28)=5,63$; $p=0,02$] e ao tempo de permanência nos braços fechados [$F(1,28)=4,59$; $p=0,04$], onde em ambos a linhagem SHR foi maior do que pela linhagem SLA16. Conforme a tabela R3 a administração de FEN 15min antes não alterou a distância total, entradas nos braços, tempo de permanência nos braços, percentual de entrada nos braços e percentual de tempo de permanência nos braços.

Estes resultados sugerem que ratas de ambas as linhagens não apresentaram comportamento do tipo ansioso/medo no LCE.

Figura 37 – Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 15min antes do teste no aparato de LCE



Fonte: O autor. Mapa de calor da ocupação de tempo médio do grupo analisado no LCE por 5 min após tratados com dose de FEN (4 mg/kg, i.p.) ou VEH. Animais foram avaliados 15 min após a administração. **(A) SHR-VEH:** movimento padrão do rato SHR 15 min após a administração de VEH. **(B) SHR-FEN:** movimento padrão do rato SHR 15 min após a administração de FEN. **(C) SLA16-VEH:** movimento padrão do rato SLA16 15min após a administração de VEH. **(D) SLA16-FEN:** movimento padrão do rato SLA16 15min após a administração de FEN. **(E) Escala:** O valor da ocupação máxima nas parcelas acima referidas foi fixado no protocolo para um valor fixo de 15 seg.

Tabela 3 Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN 15min antes do teste no aparato de LCE

	SHR		SLA16		ANOVA dois fatores		
	VEH	FEN	VEH	FEN	Linhagem	Tratamento	Interação
Distância total (m)	14,13±0,8	14,03±1,0	12,40±0,9	10,53±1,43	F(1,28)=5,63*	F(1,28)=0,80	F(1,28)=0,65
Entradas no BA (n)	14,9±1,0	14,3±1,7	13,8±0,8	14,8±3,1	F(1,28)=0,03	F(1,28)=0,01	F(1,28)=0,19
Entradas no BF (n)	12,3±0,6	13,3±1,1	11,9±2,2	11,0±1,5	F(1,28)=0,80	F(1,28)=0,00	F(1,28)=0,41
Tempo no BA (seg)	131,8±4,4	117,1±13,1	155,3±12,8	124,5±15,9	F(1,28)=1,57	F(1,28)=3,40	F(1,28)=0,42
Tempo no BF (seg)	127,4±4,7	130,9±16,3	87,8±4,7	111,9±20,9	F(1,28)=4,59*	F(1,28)=1,03	F(1,28)=0,57
% entradas no BA	54,7±1,6	53,8±1,8	56,3±5,0	55,4±5,6	F(1,27)=0,16	F(1,27)=0,05	F(1,27)=0,01
% entradas no BF	45,3±1,6	46,2±1,8	43,7±5,0	44,6±5,6	F(1,27)=0,16	F(1,27)=0,05	F(1,27)=0,01
% tempo no BA	50,9±1,7	47,7±5,6	63,2±3,2	53,7±7,2	F(1,27)=2,37	F(1,27)=0,84	F(1,27)=1,18
% tempo no BF	49,1±1,7	52,3±5,6	36,8±3,1	46,3±4,2	F(1,27)=2,37	F(1,27)=0,84	F(1,27)=1,18

Fonte: O autor. Ratos fêmeas SHR e SLA16 tratados com dose de VEH ou FEN (4 mg/kg, i.p.) e avaliados no teste de LCE 15min após a última administração. O teste avaliou a distância total e parâmetros de exploração dos braços aberto (BA) e fechado (BF) por 5 min. Os resultados foram expressos em média ± EPM (* p<0.05 VEH > FEN) com 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de dois fatores seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

4.3 TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

Nesse bloco experimental, descrito no item 3.5, animais fêmeas das linhagens SHR e SLA16 receberam uma dose de FEN (4 mg/kg, i.p.) aos 50 dias e foram imediatamente testados na caixa de atividade por 1h. Em continuidade, similar as administrações de FEN do protocolo 1, doses repetidas de FEN foram administradas nos dias 51, 53, 54, 56, 57, 59, 60, 61 e 62 dias de idade dos animais. Após a administração de FEN ou VEH, aos 62 dias os animais foram novamente testados na caixa de atividade por 1h. Durante o período de administração foi coletado diariamente o peso dos animais, a quantidade de ração e água consumidos pelos animais, os quais foram acondicionados em duplas para minimizar o estresse por isolamento social.

4.3.1 Experimento 5: Caixa de atividade após a administração aguda de FEN

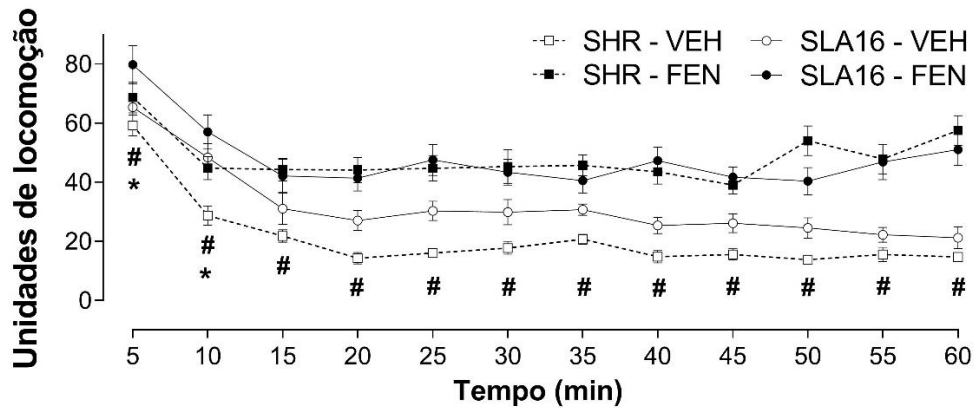
Aos 50 dias de idade os animais foram submetidos ao teste de locomoção na caixa de atividade, por um período de 1h, logo após a administração de VEH ou FEN (IP). Os dados mensurados de locomoção em intervalos de 5min (Figura 38A), foram analisados aplicando uma ANOVA de dois fatores de medidas repetidas e revelaram

um efeito do fator linhagem ao longo do tempo [$F(11,341)=1,85$; $p<0,05$]. As animais SLA16 ainda apresentaram maior atividade locomotora do que os SHR aos 5 e 10min; assim como um efeito geral de tratamento ao longo do tempo [$F(11,341)=3,47$; $p<0,01$], onde o FEN aumentou a atividade locomotora em todos os momentos (intervalos de 5min).

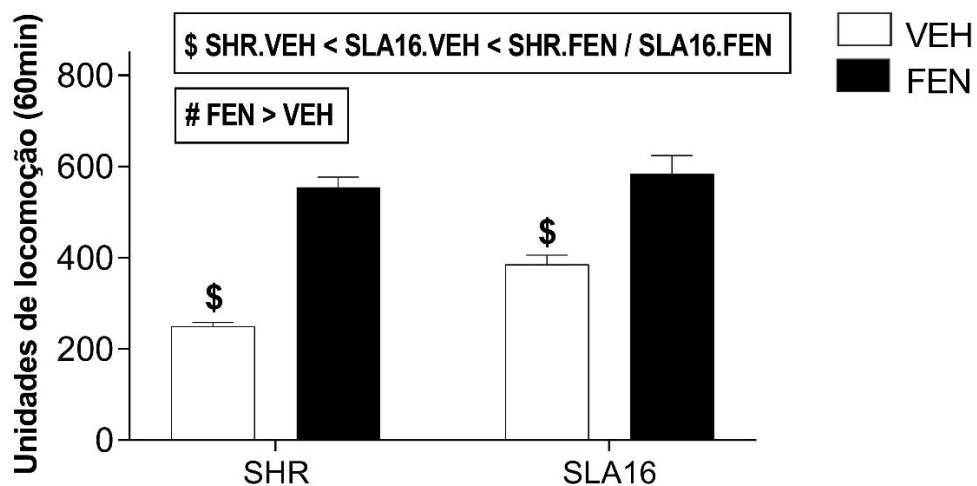
A locomoção total (Figura 38B), a qual compreende todo o tempo de 60min, foi analisada aplicando uma ANOVA de dois fatores e revelou uma interação entre linhagem e tratamento [$F(1,35)= 4,30$; $p<0,05$] onde a linhagem SHR tratada com VEH apresentou menor locomoção em relação aos demais grupos e a linhagem SLA16 apresentou menor locomoção em relação aos grupos tratados com FEN. Também houve diferença em relação aos fatores: linhagem [$F(1,35)=10,70$; $p<0,01$], sendo que os animais SLA16 apresentaram maior atividade locomotora do que os SHR; e tratamento [$F(1,35)=98,55$; $p<0,01$].

Figura 38 – Locomoção de fêmeas SHR e SLA16 aos 50 dias de idade na caixa de atividade após a administração da primeira dose de FEN

A



B



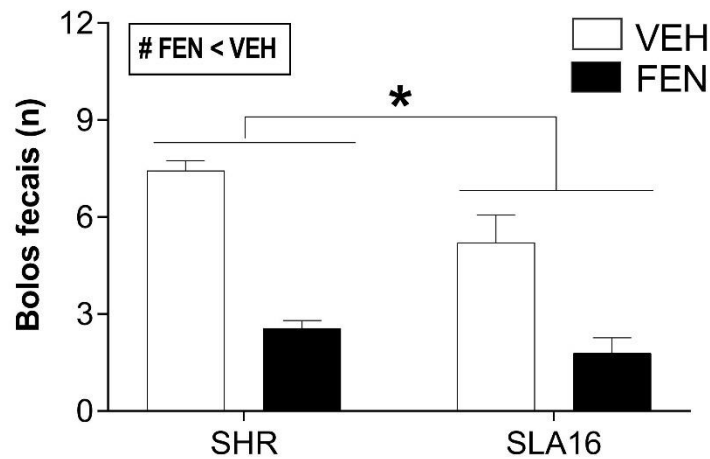
Fonte: O autor. O efeito da administração de FEN (4 mg/kg) ou VEH na indução da locomoção na caixa de atividade em animais fêmeas das linhagens SLA16 e SHR durante 60min aos 50 dias de idade (Primeira dose). **(A) Locomoção em intervalos de 5min:** O eixo "X" representa o tempo pós-tratamento e o eixo "Y" contabiliza o número total de interrupções dos sensores infravermelhos pela passagem horizontal do animal a cada 5 min (# $p < 0.05$ FEN > VEH; * SHR < SLA16). **(B) Locomoção total (60 min):** Contabilização do número total de interrupções dos sensores infravermelhos pela passagem horizontal do animal durante 60min após a administração de VEH ou FEN (# $p < 0.05$ FEN > VEH; \$ $p < 0.05$ SHR.VEH < SLA16.VEH < SHR.FEN, SLA16.FEN). Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 10 animais em cada grupo. (A) Teste ANOVA de medidas repetidas seguido por teste de comparação de médias de Duncan. (B) Teste ANOVA seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

A quantidade de bolos fecais durante os 60 min na caixa de atividade (Figura 39) foi observada após uma ANOVA de dois fatores, sendo que houve diferença no fator linhagem [$F(1,34)=7,42$; $p < 0,01$], sendo que os animais SLA16 apresentaram menor número de defecações do que os SHR. O fator tratamento [$F(1,34)=56,66$;

$p < 0,01$] revelou que os animais que receberam FEN diminuíram o número de defecações em relação aos animais que receberam VEH.

Estes resultados sugerem que ratas de ambas as linhagens aumentam a atividade locomotora e diminuem a defecação durante o teste de 60min na caixa de atividade após a administração de uma dose de FEN.

Figura 39 – Defecação de fêmeas SHR e SLA16 aos 50 dias de idade na caixa de atividade após a administração da primeira dose de FEN



Fonte: O autor. O efeito da administração de FEN (4 mg/kg) ou VEH na indução da defecação na caixa de atividade em animais fêmeas das linhagens SLA16 e SHR durante 60 min aos 50 dias de idade (Primeira dose). Contabilização do número total defecações do animal durante 60 min após a administração de VEH ou FEN (# $p < 0,05$ FEN < VEH; * SHR > SLA16). Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 10 animais em cada grupo. Teste ANOVA seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

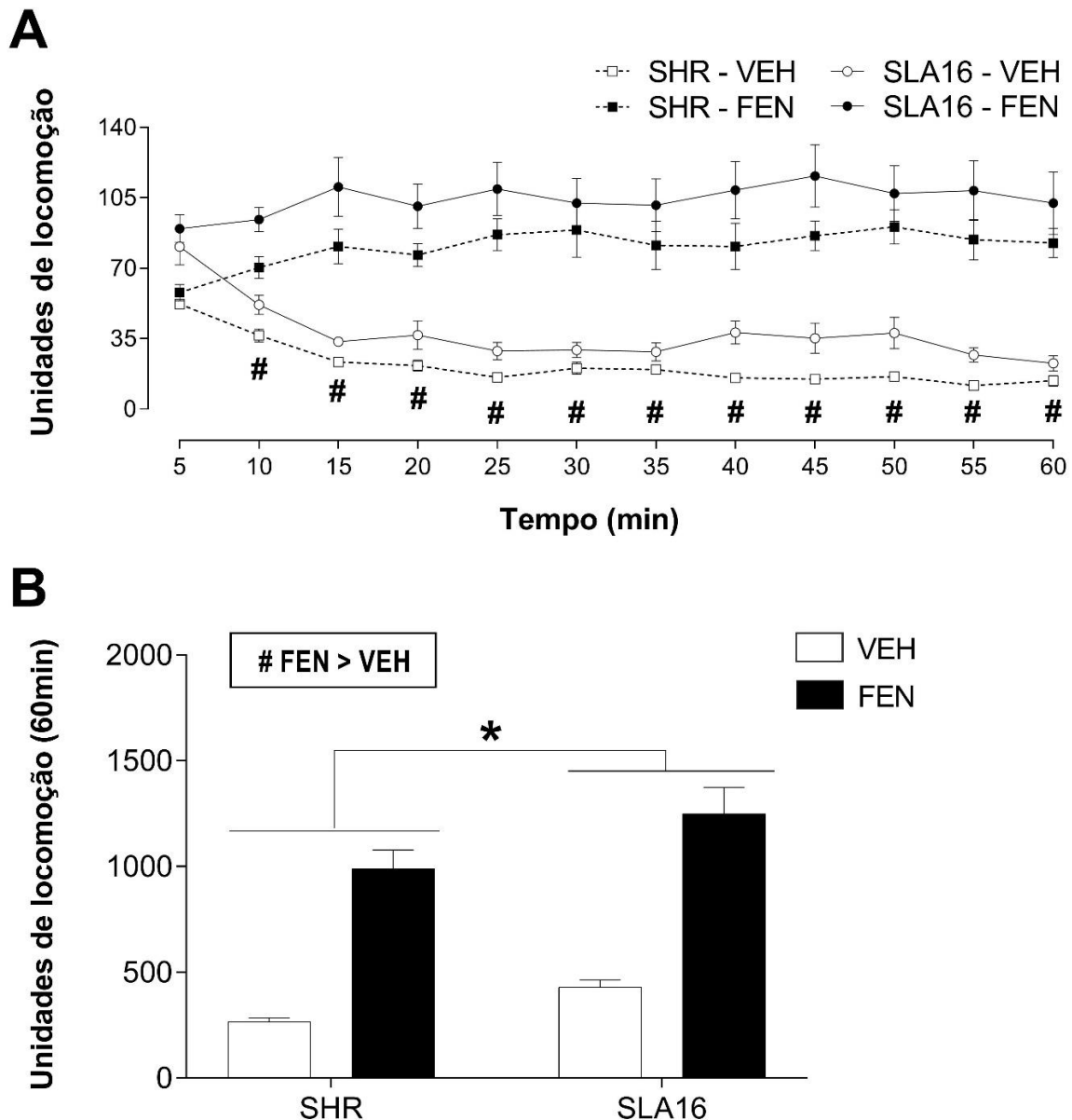
4.3.2 Experimento 5: Caixa de atividade após a administração de repetidas doses de FEN

Após a administração de doses repetidas de FEN (dos 50 aos 62 dias de idade) os animais foram novamente testados na caixa de atividade locomotora aos 62 dias de idade, imediatamente após a administração de FEN ou VEH (IP). A locomoção em intervalos de 5min (Figura 40A) foi analisada aplicando uma ANOVA de dois fatores de medidas repetidas. Um efeito geral de tratamento ao longo do tempo [$F(10,341)=1024$; $p < 0,01$] foi observado, sendo que o FEN aumentou a atividade locomotora em relação ao grupo salina em todos os intervalos a partir de 10 min.

Em relação a locomoção total avaliando todo o tempo de 60min (Figura 40B), observou-se após uma ANOVA de dois fatores que houve diferença: no fator linhagem [$F(1,35)=7,07$; $p < 0,01$], sendo que os animais SLA16 apresentaram maior atividade

locomotora do que os SHR; e no fator tratamento [$F(1,35)=94,37$; $p<0,01$], onde os animais que receberam FEN aumentaram a atividade locomotora em relação aos animais que receberam VEH.

Figura 40 – Locomoção de fêmeas SHR e SLA16 aos 62 dias de idade na caixa de atividade após a administração de repetidas doses de FEN

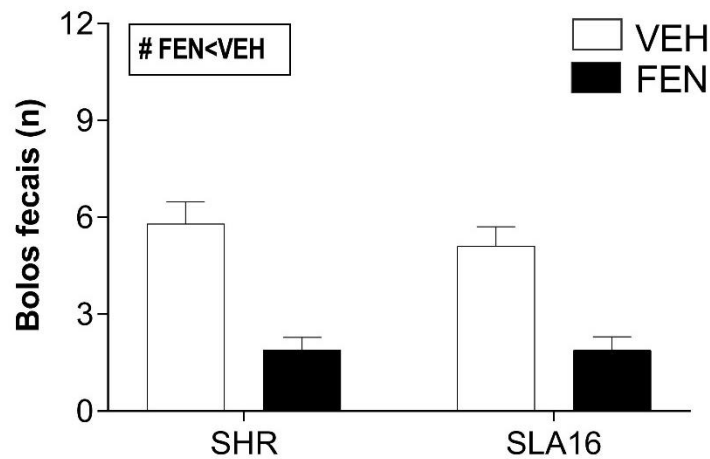


Fonte: O autor. O efeito da administração de FEN (4 mg/kg) ou VEH na indução da locomoção na caixa de atividade em animais fêmeas das linhagens SLA16 e SHR durante 60min aos 62 dias de idade após sensibilização comportamental (Doses repetidas). **(A) Locomoção em intervalos de 5min:** O eixo "X" representa o tempo pós-tratamento e o eixo "Y" contabiliza o número total de interrupções dos sensores infravermelhos pela passagem horizontal do animal a cada 5 min (# $p<0,05$ FEN>VEH). **(B) Locomoção total (60 min):** Contabilização do número total de interrupções dos sensores infravermelhos pela passagem horizontal do animal durante 60min após a administração de VEH ou FEN (# $p<0,05$ FEN>VEH; * $p<0,05$ SHR<SLA16). Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 10 animais em cada grupo. (A) Teste ANOVA de medidas repetidas seguido por teste de comparação de médias de Duncan. (B) Teste ANOVA seguido por teste de comparação de Duncan.

A quantidade de bolos fecais durante os 60 min na caixa de atividade (Figura 41) foi observada após uma ANOVA de dois fatores, sendo que houve diferença no fator tratamento [$F(1,35)=44,34$ $p<0,01$], onde os animais que receberam FEN diminuíram o número de defecações em relação aos animais que receberam VEH.

Estes resultados sugerem que ratas de ambas as linhagens aumentam a atividade locomotora e diminuem a defecação durante o teste de 60min na caixa de atividade após de repetidas doses de FEN, bem como as ratas da linhagem SLA16 demonstram maior sensibilização.

Figura 41 – Defecação de fêmeas SHR e SLA16 aos 62 dias de idade na caixa de atividade após a administração de repetidas doses de FEN



Fonte: O autor. O efeito da administração de FEN (4 mg/kg) ou VEH na indução da defecação na caixa de atividade em animais fêmeas das linhagens SLA16 e SHR durante 60 min aos 62 dias de idade (Dose repetida). Contabilização do número total defecações do animal durante 60 min após a administração de VEH ou FEN ($\# p<0,05$ FEN<VEH). Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 10 animais em cada grupo. Teste ANOVA seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

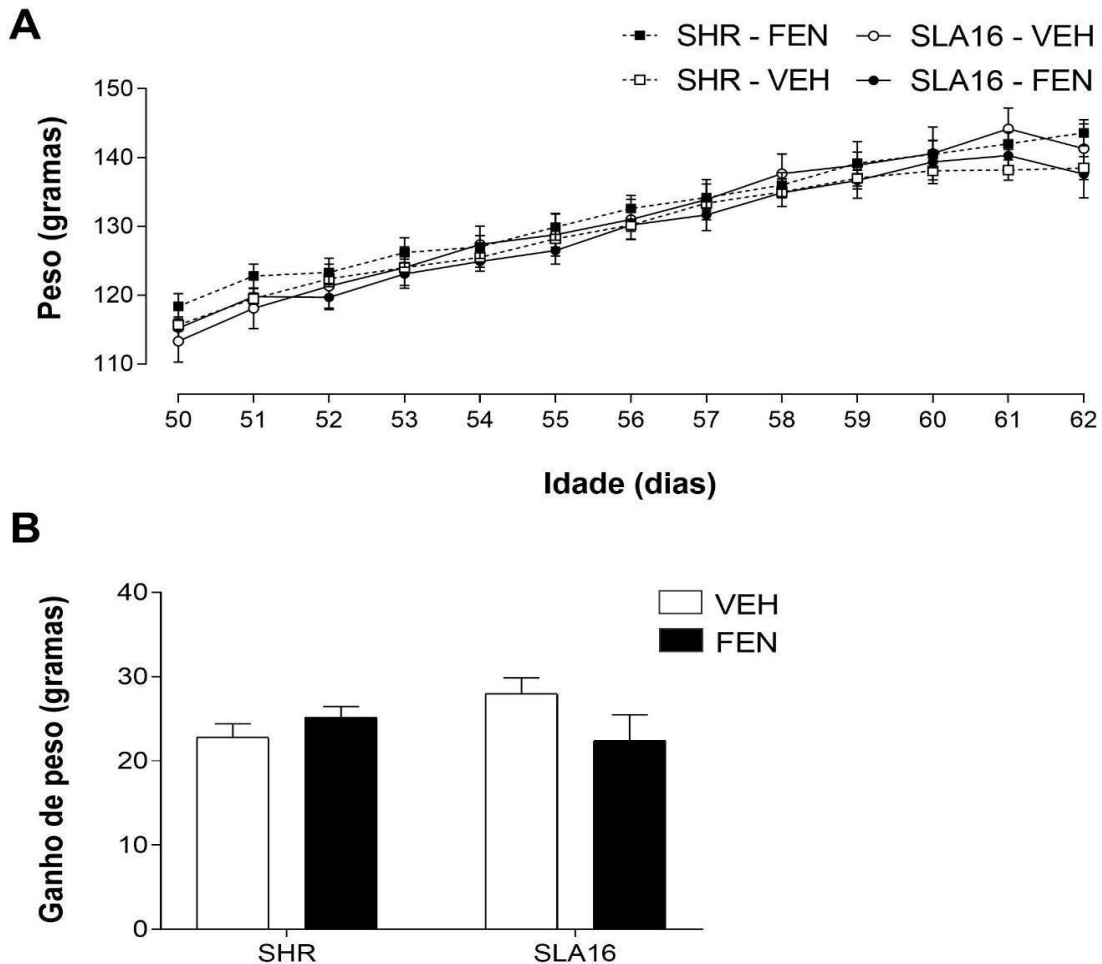
4.3.3 Experimento 5: Avaliação do peso dos animais

O peso dos animais em gramas no período entre 50 e 62 dias de idade foi avaliado após a aplicação de uma ANOVA de dois fatores de medidas repetidas (Figura 42A). Nenhuma diferença foi observada em relação aos fatores linhagem [$F(1,36)=0,16$; $p=0,69$], tratamento [$F(1,36)=0,03$; $p=0,85$] ou interação [$F(1,36)=0,92$; $p=0,34$]. Houve ganho de peso em relação ao fator tempo [$F(12,432)=318,39$; $p<0,01$].

Em relação ao ganho de peso no período (Figura 42B), concordando com os dados acima, após a aplicação de uma ANOVA de dois fatores, nenhuma diferença

de ganho de peso foi observada quanto aos fatores linhagem [$F(1,36)=0,33$; $p=0,56$], tratamento [$F(1,36)=0,59$; $p=0,44$] ou interação [$F(1,36)=3,72$; $p=0,06$].

Figura 42 – Acompanhamento do peso de fêmeas SHR e durante a administração de repetidas doses de FEN



Fonte: O autor. O efeito da administração de doses repetidas de FEN (4 mg/kg) ou VEH sobre o peso de animais fêmeas das linhagens SLA16 e SHR. **(A) Peso (50 a 62 dias de idade)**: Peso dos animais em gramas durante os dias de idade aos quais foram administradas doses de FEN ou VEH. **(B) Ganho de peso**: Ganho de peso entre os 50 e os 62 dias de idade dos animais. Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 10 animais em cada grupo. (A) Teste ANOVA de medidas repetidas seguido por teste de comparação de médias de Duncan. (B) Teste ANOVA seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

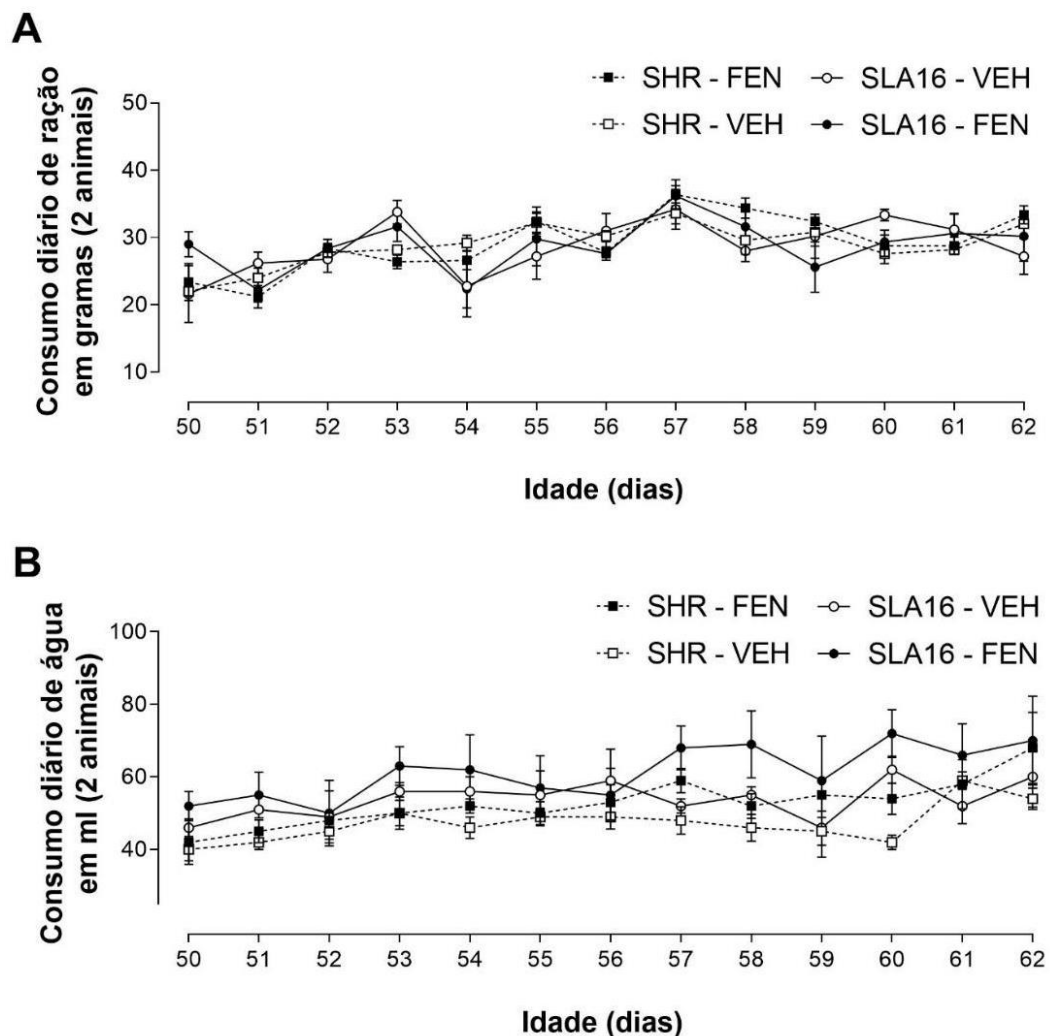
4.3.4 Experimento 5: Avaliação do consumo de ração e água

O consumo de ração dos animais em gramas no período entre 50 e 62 dias de idade foi avaliado após a aplicação de uma ANOVA de dois fatores de medidas repetidas (Figura 43A). Nenhuma diferença foi observada em relação aos fatores linhagem [$F(1,16)=0,99$; $p=0,33$], tratamento [$F(1,16)=0,16$; $p=0,69$] ou interação

[F(1,16)=0,01; p=1,00]. Houve aumento do consumo ao longo do tempo [F(12,144)=10,78; p<0,01].

O consumo de água dos animais em milímetros no período entre 50 e 62 dias de idade foi avaliado após a aplicação de uma ANOVA de dois fatores de medidas repetidas (Figura 43B). Nenhuma diferença foi observada em relação aos fatores linhagem [F(1,16)=3,00; p=0,10], tratamento [F(1,16)=2,26; p=0,15] ou interação [F(1,16)=0,06; p=0,80]. Houve aumento do consumo ao longo do tempo [F(12,192)=5,90; p<0,01].

Figura 43 – Acompanhamento do consumo de ração e água de fêmeas SHR e durante a administração de repetidas doses de FEN



Fonte: O autor. O efeito da administração de doses repetidas de FEN (4 mg/kg) ou VEH sobre o consumo de ração e água de animais fêmeas das linhagens SLA16 e SHR. **Consumo diário de ração (2 animais)**: Consumo de ração dos animais em gramas durante os dias de idade aos quais foram administradas doses de FEN ou VEH. **(B) Consumo diário de água (2 animais)**: Consumo de água dos animais em mililitros durante os dias de idade aos quais foram administradas doses de FEN ou VEH. Os resultados foram expressos em média \pm EPM, de 10 animais em cada grupo. (A) e (B) Teste ANOVA de medidas repetidas seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou, pela primeira vez, os efeitos da administração de FEN sobre os comportamentos de PLC e psicomotores e receptores dopaminérgicos do núcleo NAc, em ratas das linhagens SHR e SLA16. Como resultados principais, após a administração de repetidas doses de FEN (4 mg/kg) mostramos em um primeiro bloco experimental que ratas: (i) SHR e SLA16 apresentaram PLC induzida por FEN em protocolo de 9 dias, e que o condicionamento ocorreu mais rapidamente na linhagem SLA16; (ii) SHR e SLA16 *naïve* não apresentaram diferença quanto ao tempo de permanência nos compartimentos A ou B do aparato de PLC em estado livre de droga; (iii) de ambas as linhagens, após a administração de FEN, diminuíram o tempo e o número de entradas no centro do CA; (iv) no LCE não demonstraram diferença em relação a linhagens e ao tratamento quanto ao percentual de tempo no braço aberto e fechado; (v) O FEN aumentou a quantidade de TH no NAc em relação ao grupo VEH, sem diferença entre linhagens; (vi) o FEN diminuiu a quantidade de DRD2 no NAc em relação ao grupo VEH, sem diferença entre linhagens; (vii) o FEN não alterou a quantidade de DRD1 no NAc (administrado 22 ± 1 h antes), entretanto a quantificação desse foi menor em todos os grupos da linhagem SLA16 em comparação aos SHR.

Em um segundo bloco experimental observamos que: (viii) no CA, 15min ou 22 ± 1 h após a administração de dose de FEN, a droga é capaz de modificar os comportamentos psicomotores de exploração central, *grooming*, *sniffing* e movimentos verticais e que as linhagens responderam distintamente em diversos parâmetros analisados, assim como observou-se uma diminuição na locomoção e na aceleração na linhagem SLA16 (dose 15min antes); (ix) no LCE nenhuma diferença entre linhagens ou tratamentos pode ser constatada.

Por fim, um terceiro bloco experimental demonstrou que: (x) o FEN, durante um protocolo de 12 dias, não foi capaz de modificar o peso dos animais, consumo de água e ração, assim como não foi constatada diferença entre as linhagens; (xi) na caixa de atividade o FEN foi capaz de aumentar a atividade locomotora dos animais após a administração de uma única dose, e é capaz de produzir resposta locomotora distinta entre as linhagens durante um tratamento de doses repetidas; assim como (xii) foi capaz de diminuir a defecação dos animais mesmo após uma única dose.

Primeiro Bloco Experimental

O FEN foi um fármaco utilizado para o tratamento da obesidade que apresenta, em estudos clínicos e pré-clínicos, alterações sobre o metabolismo (REZIN *et al.*, 2011; 2014; GONÇALVES *et al.*, 2013; TEODORACK *et al.*, 2015), estados de humor (REZIN *et al.*, 2013; 2014; GOMES *et al.*, 2017; CANCELIER *et al.*, 2017), memória (REZIN *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2015) e comportamento (MATTEI; CARLINI, 1996). Para compreender os possíveis efeitos hedônicos do tratamento com FEN utilizamos um protocolo de PLC, o qual é um dos modelos de teste mais populares em pesquisas pré-clínicas para avaliar o comportamento motivado de tratamentos medicamentosos (TZSCHENTKE, 2007). Uma questão importante durante o uso da PLC é se os animais, sem a administração de droga, demonstram preferência prévia por um dos lados do aparato ao qual será atribuído o contexto (TZSCHENTKE, 1998; 2007). Dessa forma, realizamos um primeiro experimento (Item 3.3.1) em ratas das linhagens SHR e SLA16 em estado livre de droga (*naïve*) aos 52, 55 e 58 dias de idade, onde nenhuma diferença quanto ao tempo de permanência nos compartimentos A ou B do aparato de PLC foi observada (Item 4.1.1 e Figura 17). Nosso contexto apresentou-se imparcial (*unibased*), uma vez que os animais permaneceram aproximadamente metade do tempo em cada compartimento do aparato.

Em um segundo experimento (Item 3.3.2), o FEN (4 mg/kg, i.p.) induziu significativamente a PLC em ambas as linhagens, sugerindo que a droga possui efeitos hedônicos capazes de desenvolver o abuso em fêmeas SHR e SLA16 durante um delineamento experimental de 9 dias (Itens 4.1.2.1 e 4.1.2.2 e Figuras 18 e 19). Os resultados destes dois primeiros experimentos sugerem que a aquisição da PLC no experimento deveu-se apenas aos efeitos reforçadores do FEN e não a vieses comportamentais dos animais. Acreditamos que o condicionamento de PLC foi desenvolvido pela notória capacidade do FEN, uma substância do tipo anfetamina, atuar como uma pró-droga ao ser biotransformado nos enantiômeros de anfetamina (dextrógiro e levógiro) (CODY; VALTIER; STILLMAN, 1999; KRAEMER *et al.*, 2000; PAUMGARTTEN; PEREIRA, DE OLIVEIRA, 2016). De fato, em ratos machos Sprague-Dawley, a administração de FEN (8,4 mg/kg, i.p.) resultou em concentrações encefálicas de anfetamina que foram aproximadamente 89% daquelas determinadas após administração direta de anfetamina (i.p.) em concentração equimolar (TOGNONI; MORSELLI; GARATTINI, 1972). Em outro estudo experimental utilizando

ratos machos Sprague-Dawley, a administração de FEN (i.p.) produziu elevados níveis de d-anfetamina encefálica aos 5min e atingiu o pico aos 15min (COUTTS *et al.*, 1986). Inclusive, em humanos, a ingestão de cápsulas contendo 10 mg de FEN pode resultar em concentrações urinárias de anfetaminas superiores a 4,0 ng/ml após 3h (CODY; VALTIER; STILLMAN, 1999), sendo que concentrações de anfetamina acima de 1,0 ng/mL normalmente são consideradas positivas em um teste de triagem toxicológica (COHEN, 2009). Ainda se observa uma proporção importante de anfetamina (até 56%) liberada na urina após o uso de FEN (BECKETT; SHENOY; SALMON, 1972). Portanto, é consenso na literatura especializada que o FEN é rapidamente metabolizado em anfetamina, o que tem levado a órgãos internacionais a não autorizarem seu uso e proibir sua comercialização (ISKANDAROV; PRIMUXAMEDOVA, 2023; PAUMGARTTEN; PEREIRA, DE OLIVEIRA, 2016; WHO, 2002).

Nesse ínterim tem sido observado que diferentes protocolos de paradigma de PLC são capazes de promover o condicionamento às anfetaminas. Em um estudo com delineamento experimental de 5 dias observou-se que ratos machos jovens da linhagem Sprague-Dawley apresentaram PLC induzida pelas doses de 0,3 e 1,0 mg/kg (i.p.) de d-anfetamina, sendo que as doses foram administradas no primeiro, terceiro e quinto dias, intercalados pela administração de solução salina no segundo e no quarto dia (RADEMACHER *et al.*, 2006). Bardo, Valone e Bevins (1999) observaram que a administração intravenosa de uma dose de 0,1 mg/kg via cateter jugular é capaz de promover a PLC. Além disso, quando a via de administração foi intraperitoneal a quantidade de anfetamina administrada foi diretamente proporcional ao tempo de permanência no compartimento pareado e ao aumento da atividade locomotora. Leone e Di Chiara (1987) observaram que um tratamento com duas administrações de 1 mg/kg (i.p.) de anfetamina foi capaz de estabelecer PLC em ratos machos jovens Sprague-Dawley. Inclusive em um estudo realizado com humanos, indivíduos tratados duas vezes com comprimidos de d-anfetamina (20 mg) e duas vezes com placebo demonstraram um maior gosto pela sala pareada com anfetamina do que pela sala pareada com placebo. Enquanto o grupo de indivíduos que receberam anfetamina e placebo sem o pareamento de sala avaliaram com indiferença o gosto pelas mesmas (CHILDS; DE WIT, 2009). Esses estudos demonstram que a anfetamina é capaz de induzir a PLC e que o condicionamento a uma substância possa ser um mecanismo de comportamento preservado uma vez

que seres humanos e roedores preferem um local associado à administração de anfetaminas.

Um acumulado de evidências científicas aponta que substâncias psicoestimulantes do tipo anfetamina promovem a PLC devido ao desenvolvimento de sensações hedônicas e comportamento de busca de recompensa mediadas pela via dopaminérgica mesolímbica, com envolvimento especial do NAc (BECKER-KRAIL; WALKER; NELSON, 2022; SPERANZA *et al.*, 2021; VOLKOW; MORALES, 2015). Por exemplo, Schiltein e colaboradores (1998) ao micro injetarem uma única dose de d-anfetamina diretamente no NAc (1,0 µg, 10,0 µg) observaram agitação psicomotora dose-dependente (locomoção, movimentos verticais e *sniffing*) e indução à PLC. Em um estudo elegante de Spyraiki, Fibiger e Phillips (1982) ratos adultos da linhagem Wistar submetidos ao paradigma de PLC apresentaram condicionamento durante a administração de 4 doses de d-anfetamina em diferentes concentrações (0,5 ou 1,0 ou 5,0 mg/kg). Nesse estudo, a depleção de DA no NAc promovida pela infusão de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), assim como um pré-tratamento periférico com um antagonista de DRD2 (haloperidol) foram capazes de inibir a PLC. Entretanto, quando a 6-OHDA foi administrado diretamente no estriado dorsal não foi capaz de modificar a indução de PLC por d-anfetamina (SPYRAKI; FIBIGER; PHILLIPS, 1982). Além disso, a reintegração induzida por drogas tem sido associada ao aumento da liberação de DA no NAc (DI CIANO; BLAHA, PHILLIPS, 2001; VEZINA *et al.*, 2002), enquanto a infusão de antagonistas de DA no NAc atenua a retomada da busca de drogas (ANDERSON; SCHMIDT; PIERCE, 2006; SHAHAM; STEWART, 1996.). Esses achados apoiam a tese de que os efeitos reforçadores da anfetamina são mediados por neurônios centrais e, em particular, que a transmissão de DA no NAc tem um papel crítico no estabelecimento do comportamento de busca de drogas.

De fato, estimulantes do tipo anfetamina promovem a liberação e inibem a recaptção de DA de neurônios dopaminérgicos da via mesolímbica, cujos corpos neuronais estão localizados no VTA e as terminações axonais dopaminérgicas pré-sinápticas se projetam ao NAc (PRUS, JAMES, ROSECRANS, 2009). Para que ocorra a biossíntese da DA pelos neurônios dopaminérgicos da via mesolímbica há necessidade de hidroxilação do aminoácido L-tirosina em L-DOPA pela enzima limitante TH. Em seguida, o composto L-DOPA sofre descarboxilação pela ação da DA descarboxilase formando DA. Essa ficará estocada em vesículas sinápticas até a ocorrência de um potencial de ação que promova sua liberação na fenda sináptica

para ligar-se a seus receptores pós e pré-sinápticos (autoreceptores). Ou seja, nas terminações dopaminérgicas pré-sinápticas de neurônios que se projetam ao NAc a TH desempenha um papel crucial no *turnover* da DA (DAUBNER; LE; WANG, 2011; SPERANZA *et al.*, 2021).

Em nosso experimento (Item 4.1.2.4 e Figura 25), ratas das linhagens SHR e SLA16 que receberam repetidas doses de FEN apresentaram maior quantidade de proteína TH quando comparadas com o grupo VEH. Nesse sentido, tem sido relatado que o uso de drogas psicoestimulantes podem estar associado ao aumento da atividade da TH nos terminais nervosos dopaminérgicos ou na via mesolímbica (DIETZ *et al.*, 2005; FISCHER *et al.*, 2001; MANDELL; MORGAN, 1970; ZHANG; ANGULO, 1996). Por exemplo, em um estudo com ratos adultos Sprague-Dawley, que receberam anfetamina (1 mg/kg, i.p.) diariamente durante 9 dias, o mRNA da TH foi suprarregulado (*upregulated*) no VTA e na substância negra em comparação ao grupo que recebeu salina (DIETZ *et al.*, 2005). Além disso, a administração de um inibidor de TH (alfa-metil-para-tirosina) demonstrou reduzir o efeito estimulante da anfetamina sobre a locomoção e atenuar a PLC, sugerindo que o aumento da atividade da TH esteja envolvida nessas respostas comportamentais (DILULLO; MARTIN-IVERSON, 1992; MECHANIC; MAYNARD; HOLLOWAY, 2003). Por outro lado, doses mais elevadas de psicoestimulantes parecem desencadear neurotoxicidade e diminuição da TH (HOTCHKISS; GIBB, 1980; MCCANN; RICAURTE, 2004; MUKDA *et al.*, 2020), o que também pode ser apontado como uma possível consequência da inibição aumentada do *feedback* da síntese de DA (PAN *et al.*, 2006).

Deve ser observado que vários estudos demonstraram que a linhagem SHR apresenta uma menor expressão da TH em diferentes áreas do SNC, incluindo o NAc, quando comparados as linhagens Wistar, WKY e ratos de alta excitabilidade (NHE) (AKIYAMA; YABE; SUTOO, 1992; LEÃO *et al.*, 2021; LEO *et al.*, 2003; VIGGIANO; VALLONE; SADILE, 2004). Conjuntamente a redução de TH, tem sido observada uma redução basal da liberação de DA no corpo estriado e no NAc de ratos SHR em relação à linhagem controle WKY (FUJITA *et al.*, 2003; LINTHORST *et al.*, 1991; RUSSELL *et al.*, 1995; RUSSEL, 2003a, 2003b; VAN DEN BUUSE *et al.*, 1991). Algumas hipóteses foram formuladas para explicar os motivos que levam a essa função hipodopaminérgica de ratos SHR. Segundo Akiyama, Yabe e Sutoo (1992), a linhagem SHR apresenta uma expressiva redução de cálcio sérico, que poderia resultar na diminuição dos níveis de TH e, subsequentemente, diminuir os níveis de

DA observados nas regiões do neostriado e NAc, promovendo os fenótipos de hipertensão e comportamentais característicos da linhagem. Para Russell (2003) a função hipodopaminérgica possivelmente resulta de uma incapacidade das vias glutamatérgicas promoverem liberação de DA no NAc, o que resultaria no desenvolvimento de um comportamento semelhante ao TDAH. Em relação ao TDAH, a busca pelo alívio dos sintomas de TDAH pode facilitar o uso e a dependência de substâncias do tipo anfetamina (OHLMEIER *et al.*, 2008; RASMUSSEN; LEVANDER, 2009).

Independentemente dos mecanismos morfofuncionais que levam a um conjunto de alterações bioquímicas nos corpos estriados (incluindo o NAc) dos ratos SHRs, a mesma parece estar parcialmente conservada em animais SLA16, uma vez que a quantidade de TH e DRD2 foram as mesmas entre as linhagens nos diferentes grupos: VEH e FEN (Figuras 25 e 27). Normalmente os compostos psicoestimulantes, como as substâncias do tipo anfetamina, promovem um aumento da quantidade de DA na fenda sináptica estabelecida por neurônios pré-sinápticos dopaminérgicos que se projetam do VTA ao NAc. O NAc, por sua vez contém neurônios pós-sinápticos (neurônios espinhosos médios) com receptores dopaminérgicos (DRD1 e DRD2) que mediam e promovem uma sequência de eventos nos mecanismos hedônicos de motivação e recompensa, tanto em modelos animais quanto em humanos (BAIK; 2013; DREVETS *et al.*, 2001; HIROI; WHITE, 1991; WISE, 2002; HOFFMAN; BENINGER, 1989). Em razão do aumento da quantidade de DA liberada na fenda sináptica, devido aos mecanismos farmacológicos dos psicoestimulantes, esperam-se alterações moleculares como uma subregulação (*downregulation*) dos receptores dopaminérgicos (NADER *et al.*, 2006; VOLKOW *et al.*, 2001; VOLKOW; MORALES, 2015). Em nosso estudo (experimento 2), observamos que o grupo FEN apresentou diminuição da quantidade de DRD2 no NAc em relação ao grupo VEH (Figura 27). Em roedores, níveis baixos de DRD2 basais no corpo estriado estão associados à impulsividade e predizem a administração crescente e compulsiva de psicoestimulantes e um aumento da atividade dopaminérgica (EVERITT *et al.*, 2008). Assim, níveis basais de DRD2 no corpo estriado podem mediar o risco de consumo compulsivo de drogas, em parte, prejudicando as regiões do córtex pré-frontal que inibem respostas prepotentes e permitem flexibilidade de escolhas comportamentais em função de mudanças ambientais (VOLKOW *et al.*, 2006). Além disso, quando administrado sistemicamente (i.p.) um agonista de DRD2 (quinpirole), durante 8 dias,

produziu-se PLC (semelhante à anfetamina) (HOFFMAN *et al.*, 1988). Enquanto um antagonista de DRD2 (metoclopramida) foi eficaz no bloqueio da PLC por d-anfetamina (2,0 mg/kg), administrada durante 8 dias, em ratos Wistar com peso entre 225 e 300 gramas (HOFFMAN; BENINGER, 1989).

Apesar da quantidade de DRD2 e de TH representarem um indicativo de aumento da atividade dopaminérgica, não foi observada diferença na quantidade de DRD1 entre os tratamentos, tanto para a linhagem SHR quanto para a SLA16 (Figura 26). Uma diferença apontada entre os receptores DRD1 e DRD2 é a sua afinidade pela DA, com o receptor DRD2 apresentando uma afinidade 10 a 100 vezes maior do que o DRD1 (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). Com base na afinidade, acredita-se que o DRD1 seja preferencialmente ativado pelo disparo fásico (de curto prazo e intenso) de neurônios dopaminérgicos, ou seja, por elevadas concentrações transitórias de DA mediadas por um estímulo; enquanto o DRD2 seria ativado em nível basal durante os padrões tônicos (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; GOTO; OTTANI; GRACE, 2007;). Dentro desse mecanismo, sob o estímulo da DA, os neurônios espinhosos médios que contém receptores DRD1 sinalizam a expectativa pela recompensa através da ativação da via direta, enquanto os neurônios espinhosos médios que contém DRD2 sustentam a motivação necessária para aquisição e busca do reforçador por meio da inibição da via indireta (VOLKOW; MORALES, 2015). Durante o uso de psicoestimulantes tem sido observado que os DRD2 respondem tonicamente às concentrações extracelulares nanomolares de DA, enquanto os DRD1 requerem concentrações micromolares de DA para responderem de forma fásica (RUSSELL, 2003). Presumivelmente, a estimulação de DRD1 só ocorre de maneira rápida quando os medicamentos/drogas atingem concentrações máximas, enquanto que à medida que a concentração de DA começa a diminuir, os DRD2 são os receptores predominantemente estimulados (LUO *et al.*, 2011). Em nosso (experimento 2), possivelmente, os animais estavam sob uma resposta dopaminérgica tônica, uma vez que foram eutanasiados 22 ± 1 h após a administração de uma dose de FEN. E, também deve ser observado que após a administração da dose de FEN (i.p.), COUTTS e colaboradores (1986) encontraram que o pico encefálico de d-anfetamina em ratos é atingido aos 15 min.

Ainda em referência ao experimento 2 (Figura 18), observamos que a linhagem SLA16 desenvolveu PLC durante o primeiro ensaio e manteve a PLC durante os ensaios subsequentes, enquanto a linhagem SHR necessitou de um maior

número de ensaios, ou seja, um maior número de doses de FEN no compartimento pareado para o desenvolvimento e estabelecimento da PLC. Esses dados confirmam nossas hipóteses de que a PLC causada pelo FEN seria estabelecida em ambas as linhagens e que se apresentaria distinta entre as ratas SHR e SLA16. Atualmente, a linhagem de ratos SHR representa o melhor modelo animal de TDAH, pois mimetiza os sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade (MILLER, 2019; SAGVOLDEN, 2000; VOLKOW; FOWLER; WANG, 2009). E, como validade de constructo dos SHR em relação a esse transtorno, estudos sugerem uma função hipodopaminérgica, uma vez que em relação aos ratos WKY (controles isogênicos naturais) os SHR apresentam: diminuição da expressão de TH no neocórtex e NAc (FULLER *et al.*, 1983; RUSSELL, 2003), redução da concentração de DA extracelular basal no núcleo caudado e NAc (FUJITA *et al.*, 2003, 2004; LINTHORST *et al.*, 1991) e suprarregulação da expressão de DRD1 e DRD2 no NAc, estriado e córtex frontal (CAREY *et al.*, 1998; KIROUAC, GANGULY, 1993; LIM *et al.*, 1989; PAPA *et al.*, 2002).

Essa condição psiquiátrica pode promover o surgimento de TUS devido a desarranjos estruturais e funcionais preexistentes no sistema de recompensa encefálico (GIGLIOTTI; GUIMARÃES, 2017; VENDRUSCOLO; IZIDIO; TAKAHASHI, 2009; VIGGIANO *et al.*, 2004). Por exemplo, ratos SHR tratados na adolescência com metilfenidato (1,25, 5 e 20 mg/kg, i.p.) durante 6 dias apresentaram PLC para o medicamento (DELA PEÑA *et al.*, 2011). Em outro estudo, ratos SHR pré-tratados com anfetamina por 7 dias (5 mg/kg, i.p.) mostraram PLC e comportamento de autoadministração da droga (DELA PEÑA, 2015). Observa-se ainda que em ratos a hiper-reatividade motora e o comportamento impulsivo (BAILEY, 2023) podem estar correlacionados a um comportamento de adição e o estabelecimento de PLC (BEVINS; KLEBAUR; BARDO, 1997; HOOKS *et al.*, 1992; LE FOLL *et al.*, 2009; TU *et al.*, 2019; YATES *et al.*, 2012). Nesse interim, em estudos anteriores comparando as linhagens SHR e SLA16, esta demonstrou maior reatividade motora ao longo da vida (ANSELMINI *et al.*, 2016; DE MEDEIROS *et al.*, 2014; GRANZOTTO, 2022; PÉRTILE *et al.*, 2017), maior déficit de aprendizagem (ANSELMINI *et al.*, 2016; VELÁZQUEZ *et al.*, 2019) e maior tomada de riscos em áreas aversivas dos aparatos, o que pode ser tomado como impulsividade (RAMOS *et al.*, 2023). Ou seja, essas características comportamentais relacionadas ao TDAH são ainda mais pronunciadas na linhagem SLA16. O que pode ter favorecido o estabelecimento da PLC, uma vez

que o TUS é uma das comorbidades mais prevalentes no TDAH e o aumento na intensidade dos sintomas parecem estar diretamente relacionada ao aumento do consumo de drogas que promovam a liberação de DA e consequente alívio dos sintomas em pacientes (OHLMEIER *et al.*, 2008; RASMUSSEN; LEVANDER, 2009).

Considerando que TH e DRD2 (Figura 25 e 27) encontram-se de maneira semelhante entre as linhagens no NAc e que a linhagem SLA16 estabeleceu a PLC de maneira consistente e mais rapidamente do que a linhagem SHR, seria esperado que no NAc da linhagem SLA16 demonstrasse um aumento da quantidade de DRD1 no NAc, já que a estimulação desses pode produzir recompensa a psicoestimulantes em roedores (BENINGER; MILLER, 1998; CAINE *et al.*, 2007). Entretanto, contraintuitivamente houve aumento da quantidade de DRD1 na linhagem SHR e diminuição na linhagem SLA16 em todos os grupos (Figura 26). De fato, a visão clássica teórica sobre o campo postula que os neurônios espinhosos médios que expressam DRD1 no NAc codificam sinais de recompensa devido ao aumento do tônus dopaminérgico diretamente ao VTA (BARDO, 1998; HIKIDA *et al.*, 2010). Apesar disso, deve ser observado que os neurônios espinhosos médios contendo DRD1 e DRD2, normalmente, não disparam independentemente um do outro e, é provável que o equilíbrio da sinalização do estriado ventral entre as vias direta (DRD1) e indireta (DRD2) contribua às diferentes respostas aos medicamentos e que um desequilíbrio entre estas vias possa, em última análise, estar subjacente às mudanças comportamentais observadas na dependência (VOLKOW; MORALES, 2015).

Também é proposto que a liberação de DA tônica, ao estimular DRD2, regula a intensidade da resposta dopaminérgica fásica ao definir um nível de fundo da estimulação dos DRD2 (tanto autorreceptor quanto pós-sináptico) (GRACE, 1991). Além disso, alguns estudos clínicos e pré-clínicos também têm demonstrado tanto recompensa como aversão tanto para agonistas de DRD1 quanto para de DRD2 (BENINGER; MILLER, 1998; VOLKOW; MORALES, 2015). Por exemplo, a estimulação optogenética breve dos neurônios espinhosos médios tanto de DRD1 quanto de DRD2 provocou reforço positivo e aumento do condicionamento à cocaína. Por outro lado, a ativação prolongada desses induziu à aversão, bem como produziu efeitos eletrofisiológicos notavelmente distintos no VTA e no globo pálido (SOARES-CUNHA *et al.*, 2020). Segundo Soares-Cunha e colaboradores (2020) os neurônios espinhosos médios do tipo DRD1 e DRD2 podem controlar bidirecionalmente à recompensa e à aversão, o que explica a existência de estudos controversos na área

(BENINGER; MILLER, 1998). Considerando conjuntamente os dados de PLC, TH, DRD2 e DRD1 pressupõe-se uma associação de sinalização distinta da via direta promovida por DRD1 e o estabelecimento da PLC nas linhagens SHR e SLA16. Nesse sentido, alguns estudos apontam que uma melhor sinalização do DRD1 no NAc, o qual estimula o AMPc, promove facilitação da recompensa e ao condicionamento às drogas psicoestimulantes (EVA *et al.*, 2006; GORE; ZWEIFEL, 2013; GREENGARD; ALLEN; NAIRN, 1999; ZWEIFEL *et al.*, 2009). Fatores que podem estar envolvidos em uma maior sinalização do DRD1 no NAc serão discutidos mais adiante juntamente aos resultados do experimento 5.

Dando continuidade ao experimento 2, para avaliação do comportamento psicomotor, os animais foram submetidos aos testes de CA (Figuras 20, 21, 22 e 23) e LCE (Tabela 1 e Figura 24), respectivamente nos dias 61 e 62 dias, 22 ± 1 h após a última administração de FEN. No CA, novamente a linhagem SLA16 apresentou maior distância total percorrida em ambientes novos em relação a linhagem SHR. Esse comportamento hiperlocomotor já havia sido observada anteriormente em trabalhos do LGC/UFSC (ANSELMINI *et al.*, 2016; DE MEDEIROS *et al.*, 2014; GRANZOTTO, 2022; PÉRTILE *et al.*, 2017, RAMOS *et al.*, 2023), o que se reflete nos tempos de *sniffing* uma vez que os animais cheiram enquanto andam (Figura 23A) (ZHANG *et al.*, 2011). Essa característica fenotípica pode estar de alguma forma relacionada ao estabelecimento da PLC, uma vez que alguns experimentos têm proposto que ratos com o fenótipo alta responsividade locomotora à novidade são candidatos a desenvolverem um fenótipo de vulnerabilidade à dependência (BELIN *et al.*, 2008, 2011 EVERITT *et al.*, 2008; PIAZZA *et al.* 1989), bem como um desequilíbrio da atividade dopaminérgica no NAc (BURKE; WATT; FORSTER, 2011; IKEMOTO, 2002; KAI *et al.* 2015; MESSIER *et al.* 1991). Entretanto, em nosso experimento o FEN, no CA de 5min, não promoveu aumento da distância total percorrida no teste (Figura 20A).

Em um estudo realizado por Gonçalves e colaboradores (2015) pode ser observado que ratos Wistar cronicamente tratados com FEN (6,25 mg/kg, i.p.) durante 14 dias e testados 24h após a última injeção também não apresentaram aumento da atividade locomotora em um CA de 5min em relação aos animais que receberam somente veículo. De maneira similar, Tsai e Lin (1988) documentaram valores próximos de atividade locomotora durante os 10 min iniciais entre animais tratados com d-anfetamina (1 mg/kg) e solução salina no CA. Inclusive, Myers e colaboradores

(1982) verificaram em um teste de CA de 3 min que ratas SHR que receberam d-anfetamina (1,7 mg/kg, i.p.) diminuíram sua movimentação em relação ao grupo que recebeu solução salina e apresentaram tendência à diminuição dos movimentos verticais (efeito similar ao nosso – Figuras 20A e 20B). Entretanto, no mesmo trabalho quando ratos SHR receberam anfetamina (2 mg/kg, i.p.) e foram testados na caixa de atividade por 60 min, verificou-se que esse efeito locomotor ocorre apenas durante as fases iniciais do teste (15min), enquanto as taxas de atividade do grupo controle são maiores (MYERS *et al.*, 1982). Portanto, tal efeito possivelmente deve-se ao aumento da reatividade locomotora inicial dos grupos recém expostos a um aparato, o qual deve ser levado em consideração durante a interpretação de testes de curta duração e no delineamento dos protocolos experimentais.

No CA (Experimento 2), o FEN administrado em doses repetidas foi capaz de, em ambas as linhagens, diminuir: o número de entradas no centro (Figura 20D), o tempo no centro (Figura 20E), a distância percorrida no centro (Figura 20B), o tempo médio por visitas ao centro (Figura 22A), bem como aumentar: o tempo na periferia (Figura 20F) e o tempo médio por visita à periferia (Figura 22B). Esses dados podem ser interpretados em conjunto como um comportamento do tipo ansioso desenvolvido 22±1h após a última administração de FEN. De fato, a exploração da região central do aparato no teste de CA representa uma medida relacionada aos níveis de ansiedade experimentados pelos roedores, uma vez que esses tendem a se mover na periferia em contato com uma superfície vertical (comportamento de tigmotaxia) para se proteger de eventuais predadores (BARNETT, 2017; DUARTE *et al.*, 2013; RAMOS *et al.* 1997, 2023). De maneira similar, após a administração crônica de anfetamina em ratos, tem sido verificado aumento do comportamento do tipo ansioso quando medida 24h ou até 4 semanas após a retirada (BARR *et al.*, 2010; VUONG *et al.*, 2010). Nesse sentido Gonçalves e colaboradores (2015) relataram que ratos Wistar machos que receberam FEN (6,25, 12,5 e 25 mg/kg) durante 14 dias e foram testados 24h após a última administração no LCE apresentaram um aumento no tempo de permanência no braço fechado em relação ao grupo controle de forma dose-dependente.

De acordo com Carobrez e Bertoglio (2005), no LCE as características aversivas dos braços abertos em comparação a dos braços fechados parecem ser necessárias para que os animais desenvolvam evitação de braço aberto, e a evitação pode ser correlacionada a um comportamento do tipo ansioso/medo. Entretanto, em

nosso experimento o teste de LCE (tabela 1 e Figura 24) não apresentou diferenças de tratamento e de linhagem referentes ao tempo de permanência e de entradas nos braços abertos e fechados. Com base nesse antagonismo entre os resultados dos testes de CA e LCE, desenvolvemos outros dois estudos: um experimento de administração de dose única de FEN 22±1h antes da realização dos testes comportamentais de CA e LCE (Experimento 3) e um experimento de administração de dose única de FEN 15min antes da realização dos testes comportamentais de CA e LCE (Experimento 4).

Segundo Bloco Experimental

No teste de CA do experimento 3 (Item 3.4.1), a linhagem SLA16 novamente apresentou maior distância total percorrida do que a linhagem SHR (assim como o tempo de *sniffing*, Figuras 28A e 31A) e nenhuma diferença entre os tratamentos foi observada o que vai ao encontro do que foi apresentado no experimento 2 e previamente discutido. Ainda observamos no CA, em ambas as linhagens, que uma dose única de FEN (aplicada 22±1h antes do teste) foi capaz de diminuir o tempo no centro (Figura 28E), aumentar o tempo na periferia (Figura 28F) e a distância percorrida na periferia (Figura 22B), assim como observou-se uma tendência de diminuição da distância percorrida na área central (Figura 28B) e de aumento no tempo médio por visita à periferia do CA (Figura 30B). Novamente, em conjunto esses dados poderiam ser interpretados como um aumento do comportamento do tipo ansioso.

Na literatura é apontado que 1 a 72h após a descontinuidade do tratamento com psicoestimulantes pode ocorrer uma sequência de eventos bioquímicos e moleculares que levam a mudanças duradouras (ou permanentes) da atividade neural dos sistemas motor e de recompensa do SNC (MISERENDINO; NESTLER, 1995; NORDQUIST *et al.*, 2008; PIERCE; KALIVAS, 1997). Esse fenômeno conhecido por sensibilização comportamental é altamente replicável e envolve a via mesocorticolímbica. Do ponto de vista comportamental é caracterizado pela manifestação de um aumento da atividade locomotora após a administração de uma dose desafio do psicoestimulante em animais que se encontram em abstinência (KALIVAS; SORG; HOOKS, 1993; PIERCE; KALIVAS, 1997). Por exemplo, em um estudo de Pires e colaboradores (2008) camundongos SWISS ao receberem uma única dose de FEN (5 mg/kg) foram capazes de desenvolver sensibilidade

comportamental, uma vez que ao serem testados 10 dias após com uma segunda dose (5 mg/kg) aumentaram sua locomoção em relação ao grupo controle. Durante o período de abstinência de ratos sensibilizados tem sido relatada uma diminuição da atividade locomotora e aumento do comportamento do tipo ansioso (CHE *et al.*, 2013; PIERCE; KALIVAS, 1997).

Entretanto, para o desenvolvimento de adaptações neurais provenientes da sensibilização comportamental é referido a necessidade de períodos de abstinência longos (normalmente superiores a 14 dias) (KOLTA *et al.*, 1985; PAULSON; ROBINSON, 1995; PIERCE; KALIVAS, 1997; ROBINSON *et al.*, 1988; WOLF *et al.*, 1993), enquanto em nossos experimentos 2 e 3, os testes comportamentais foram realizados 22±1h após a última administração de FEN. Além disso, um dos resultados mais consistentes na literatura relacionados a sensibilização comportamental por psicoestimulantes consiste em mudanças relativamente duradouras na expressão de DRD1 no NAc, o que não foi observado em nossos animais submetidos a doses repetidas (experimento 2) (ver revisão de PIERCE; KALIVAS, 1997). E, novamente, no LCE nenhuma diferença entre entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados foi observada (Tabela 2 e Figura 32). Dessa forma, há indícios consistentes para crermos que as alterações comportamentais promovidas nos experimentos 2 e 3 são em razão da presença de FEN, ou de seu subproduto anfetamina, 22±1h após a última administração. Em um estudo utilizando ratas fêmeas Dark Agouti que receberam FEN (3 mg/kg) por gavagem observou-se quantidades superiores a 20 ng/ml de anfetamina (de cada enantiômero) no sangue dos animais mesmo após 12h, o qual foi o período máximo analisado no estudo (KRAEMER *et al.*, 2004). Apesar da carência de pesquisas com animais, possivelmente pela possibilidade da investigação diretamente em humanos, tem sido visto que indivíduos que ingeriram FEN (10 mg) durante 7 dias apresentaram anfetamina detectável na urina por um tempo superior a 150 h após o consumo da última dose, sendo a sensibilidade de detecção de 5 ng/ml (CODY; VALTIER; STILLMAN, 1999). E quando ingerida uma dose única de FEN (10 mg) foi detectado anfetamina urinária por um período superior a 110h (CODY; VALTIER, 1996). Além disso, em nosso experimento 2, houve diminuição do número e tempo do comportamento de *grooming* (Figuras 23B e 23C) acompanhada por uma tendência da diminuição do tempo de *grooming* no experimento 3 (Figura 31B), o que condiz com manifestações comportamentais etológicas referentes a presença de anfetamina

administrada em doses intermediárias e baixas de d-anfetamina (0,5 a 1,5 mg/kg) (ANTONIOU *et al.*, 1998). Segundo Antoniou e colaboradores (1998) o aumento da frequência dessas respostas indica forte mudança comportamental obtida pela presença do psicoestimulante.

No experimento 4 (Item 3.4.2), 15min após uma dose única de FEN observou-se o fator interação em diferentes parâmetros analisados no CA, sendo que o FEN na linhagem SLA16 diminuiu a atividade locomotora (Figura 33A), a velocidade máxima (Figura 34 A), bem como aumentou o tempo médio de permanência no centro (Figura 35A). Observou-se ainda que o grupo SLA16-FEN diminuiu o número de movimentos verticais em relação ao grupo SLA16-VEH (Figura 33C). Esses dados tomados em conjunto demonstram uma diminuição da atividade do grupo SLA16-FEN no CA. Em estudos anteriores, ao examinar possíveis efeitos hiperlocomotores induzidos por d-anfetamina em ratos da linhagem SHR comparados à linhagem WKY (menos ativa), foi observado no teste de CA (3 min) que a atividade locomotora dos animais SHR estava diminuída, enquanto a dos WKY aumentou após a administração de d-anfetamina (MYERS *et al.*, 1980). Outro estudo de Myers e colaboradores (1982) demonstraram que ratas SHR fêmeas e machos, 30 min após administração de d-anfetamina (com doses respectivas de 1,7 e 3,5 mg/kg, i.p.) diminuíram o número de deslocamentos no teste de CA, assim como apresentaram tendência à diminuição dos movimentos verticais em relação ao grupo que recebeu solução salina. Nesse estudo, novamente animais WKY tratados com anfetamina aumentaram o número de deslocamentos. Com base nesses achados os pesquisadores testaram os animais SHR na caixa de atividade por 60min após a administração de d-anfetamina ou salina, e verificou-se que esse “efeito paradoxal” (termo utilizado à época) ocorreu apenas durante as fases iniciais do teste (15min), quando as taxas de atividade de controle são maiores (MYERS *et al.*, 1982). Para esses pesquisadores esse “efeito paradoxal” à anfetamina é observada em crianças hiperativas e pode ser prevista como uma base de dependência a d-anfetamina. Em nosso estudo, tal efeito foi observado na linhagem SLA16, mas não na linhagem SHR. Estes resultados fornecem evidências de um efeito farmacogenético, onde a linhagem SLA16 pode ser mais sensível aos efeitos de substâncias psicoativas. Dessa forma, com intuito de avaliar temporalmente a atividade motora das linhagens no CA durante o tratamento com FEN, realizamos um teste agudo e de doses repetidas na caixa de atividade locomotora (Experimento 5).

Ainda no experimento 4 o FEN aumentou o tempo de permanência no centro e diminuiu o tempo de permanência na periferia (Figuras 33E e 33F). Em um trabalho de Rezin e colaboradores (2014) ratos adultos machos que receberam administração aguda e crônica FEN em altas doses aumentaram o número de visitas ao centro do CA, o que segundo os autores representa um comportamento de exploração do ambiente com maior tomada de risco. Além disso, em nosso experimento o FEN diminuiu o tempo de *sniffing*, o número e tempo de *grooming* (Figuras 36A, 36B e 36C). Em um estudo de Antoniou e colaboradores (1998) observou-se que doses elevadas de d-anfetamina diminuem a frequência de movimentos verticais, o comportamento de *sniffing* e a frequência e duração do comportamento de *grooming*. Em conjunto, esses achados sugerem que o caráter das respostas comportamentais psicomotoras ao FEN mudou da dose única 22±1h antes para a dose única 15min antes e que as linhagens SHR e SLA16 responderam com comportamento psicomotor distintamente à administração dose única 15min antes de FEN, o que vai ao encontro de nossa hipótese.

Terceiro Bloco Experimental

No experimento 5 (Item 3.5.1) nossos resultados confirmam que a atividade locomotora em ratas de ambas as linhagens, medida pelo método tradicional de interrupções do fotofeixe, está aumentada após o tratamento com uma única dose (4 mg/kg, i.p.) ou repetidas doses de FEN (Figuras 38 e 40). De fato, a hiperatividade induzida por FEN foi observada através do aumento da distância percorrida e/ou movimentos verticais no teste de CA ou na caixa de atividade locomotora após administração intraperitoneal em ratos Wistar machos durante distintos protocolos agudos: 2 mg/kg (PARO *et al.*, 2008), 3 mg/kg (CONCEIÇÃO *et al.*, 2017), 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg e 25 mg/kg (REZIN *et al.*, 2013) ou de doses repetidas: 2 mg/kg (PARO *et al.*, 2008), 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg (CANCELIER *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2017) e 25 mg/kg (REZIN *et al.*, 2014). Conceição e colaboradores (2017) observaram que uma única dose de FEN (3 mg/kg) foi capaz de aumentar a locomoção na caixa de atividade, tanto de ratos Wistar aos 41 dias de idade quanto de ratos aos 81 dias de idade. No experimento de Rezin e colaboradores (2014) a administração aguda e crônica (14 dias) de FEN (6,25 mg/kg) aumentou o comportamento locomotor e exploratório de ratos Wistar machos adultos (250 a 300 gramas). Os autores sugerem que as alterações induzidas são via sistema dopaminérgico, uma vez que o FEN atua

como uma droga de ação indireta ao ser rapidamente convertido em anfetamina. E, essa aumenta a quantidade de DA nas fendas sinápticas que ao interagir com os receptores DRD1 e DRD2 inicia uma sequência de eventos que induzem a hiperatividade (REZIN *et al.*, 2014). Myers e colaboradores (1982) ao administrarem d-anfetamina (2 mg/kg, i.p.) em ratos machos e fêmeas da linhagem SHR (compondo o mesmo grupo) observaram aumento na locomoção total na caixa de atividade (60min). Em outro estudo, 15 min após a administração de 0,5 mg/kg de anfetamina os animais SHR e WKY foram testados no CA por 10min, onde observou-se um maior aumento da atividade locomotora nos SHR (CALZAVARA *et al.*, 2011). Nesse sentido, a via mesolímbica tem sido considerada importante tanto para os efeitos recompensadores tanto quanto para ativação de comportamentos psicomotores desencadeados pelo uso de psicoestimulantes (PULVIRENTI *et al.*, 1991; WISE; BOZARTH, 1987). Por exemplo, lesões de 6-OHDA do NAc atenuam a ativação locomotora sistêmica induzida por anfetaminas e cocaína (KELLY, 1977), enquanto injeções intra-NAc de DA ou d-anfetamina aumentam a atividade locomotora dos animais (ESSMAN; MCGONIGLE; LUCKI, 1993; FLETCHER *et al.*, 1998; PIJNENBERG; ROSSUM, 1973; SWANSON *et al.*, 1997).

Na caixa de atividade aos 50 dias de idade foi observada uma interação em relação a locomoção total (Figura 38B), onde o grupo SLA16.VEH apresentou maior locomoção total do que a linhagem SHR.VEH, assim como aos 62 dias o fator linhagem apresentou diferença, sendo que a locomoção total foi maior na linhagem SLA16 que na linhagem SHR (Figura 40B). Como já foi demonstrado em dados anteriores do LGC/UFSC, os animais da linhagem SLA16 normalmente apresentam maiores índices locomotores do que suas linhagens parentais (SHR e LEW), especialmente em ambientes novos (ANSELM I *et al.*, 2016; DE MEDEIROS *et al.*, 2014; GRANZOTTO, 2022; PÉRTILE *et al.*, 2017; RAMOS *et al.*, 2023). Observou-se ainda que o perfil locomotor dos animais SHR e SLA16 possui particularidades ligadas ao sexo, uma vez que fêmeas tem apresentado maior índice de locomoção que machos. Por exemplo, no período pós-desmame, a média da distância total percorrida pelas fêmeas no CA durante 5 min foi de 30 metros, contra 17 metros pelos machos (GRANZOTTO, 2022). Esse perfil comportamental tem-se demonstrado basal e independente da influência dos hormônios sexuais, uma vez que ratas SHR e SLA16 não diferiram nos parâmetros locomotores e de exploração do CA, LCE e caixa branco e preta durante as diferentes fases do ciclo estral (DE MEDEIROS *et al.*, 2014;

TANIGUCHI, 2013). Para Dreher e Jackson (1989), a estimulação de DRD1 e DRD2 parecem interagir positivamente entre si, bem como podem mediar os efeitos estimulatórios locomotores aditivos induzidos pela administração sistêmica concomitante de substâncias agonistas para os receptores DRD1 e DRD2. Deve ser observado que em razão da administração ser sistêmica (i.p.), o FEN também poderia estar atuando em outros sistemas e áreas encefálicas responsáveis pelo comportamento motor. Entretanto, em estudos de nosso grupo, quando o estriado dorsolateral de ratos SHR e SLA16 foi tratado com 6-OHDA (10 µg/sítio) bilateralmente nenhuma alteração do desempenho motor foi observada em diferentes testes comportamentais (FADANNI; 2018).

Assim como as diferenças de PLC entre as linhagens SHR e SLA16 (Figura 18), a diferença de locomoção aqui observada entre as linhagens poderia ser explicada devido a uma melhor sinalização do DRD1 no NAc de animais SLA16. Além disso, observou-se que a administração diretamente no NAc de agonistas da DA para DRD1 induzem ao aumento da atividade locomotora de maneira dose dependente, enquanto a administração de antagonistas de DRD1 diminuem a atividade locomotora dos animais (BALDO *et al.*, 2002; IKEMOTO, 2002; MESSIER *et al.*, 1991). Uma vez que as linhagens isogênicas de ratos SHR e SLA16 estão submetidas aos mesmos controles ambientais e de manejo, a RGD no Chr4 das linhagens (mais especificamente ao *locus Anxrr16*) deve ser observada nesse contexto. Em um estudo de revisão entre as linhagens SHR e SLA16, Ramos e colaboradores (2023) ao analisarem o RGD observaram a presença de numerosos genes que atuam nas vias de sinalização tanto gabaérgica, dopaminérgica e glutamatérgica, bem como, apontaram genes candidatos que podem influenciar os comportamentos distintos existentes entre as linhagens. Desses, destaca-se o gene codificador para o neuropeptídeo Y (NPY), um polipeptídeo de 36 aminoácidos que é filogeneticamente conservado entre as espécies e possui no NAc uma das maiores expressões do SNC. O *Npy* é expresso principalmente em neurônios espinhosos médios no NAc e possui receptores acoplados à proteína G que podem levar a hiperpolarização da célula, regulação de outros neurotransmissores e da transcrição gênica (DUARTE-NEVES; ALMEIDA; CAVADAS, 2016; MICHEL, 1991; TANAKA *et al.*, 2021). Os receptores do NPY são encontrados em geral na membrana pós-sináptica e podem inibir a via da adenilato ciclase e mobilizar o Ca²⁺ de depósitos intracelulares, o que diminui a produção de AMPc na célula (ACUNA-GOYCOLEA *et al.*, 2005; HÄRFSTRAND;

FREDHOLM; FUXE, 1987; HERZOG *et al.*, 1992) e regula a transcrição gênica ao atuar sobre a sinalização CREB (MULLINS; ZHANG; HAWES, 2002; SHERIFF *et al.*, 2002). Além disso, injeções de NPY no NAc produzem PLC em ratos através de um possível mecanismo comum com a neurotransmissão dopaminérgica, já que essa PLC é extinta em um pré-tratamento do NAc com o antagonista de DRD1 e DRD2 (cis-flupentixol) (JOSSELYN; BENINGER, 1993).

Conforme Ramos e colaboradores (2023), com base na combinação de evidências funcionais e na posição no Chr4, outro possível elemento-chave para explicar o perfil comportamental de ratos SLA16 é o gene *Tacr1*. Este gene é responsável pelo receptor da neuroquinina-1 (NK1R), cujo ligante de maior afinidade é a substância P (SP). SP é um neuropeptídeo de 11 aminoácidos pertencente à família das taquicininas, cujo receptor é exclusivamente co-expresso em neurônios espinhosos médios DRD1 no NAc (BLOMELEY; BRACCI, 2008; BLOMELEY; KEHOE; BRACCI, 2009; LU; GHASEMZADEH; KALIVAS, 1998; MUÑOZ; COVEÑAS, 2014; SCHANK; HEILIG, 2017). Portanto, é previsto que a substância P seja responsável pelos efeitos da estimulação de alta frequência dos DRD1 no NAc (FRANCIS *et al.*, 2019). O complexo SP/NK1R é amplamente expresso no sistema nervoso e está envolvido na modulação de comportamentos relacionados com a emocionalidade e distúrbios psiquiátricos complexos (SCHANK; HEILIG, 2017; STEINHOFF *et al.*, 2014; SANTARELLI *et al.*, 2002). Por exemplo, camundongos knockout para NK1R mostraram uma notável semelhança fenotípica com os sintomas do TDAH, uma vez que os animais exibiram hiperatividade, desatenção e impulsividade (FAN; BRUNO; HESS, 2012; YAN *et al.*, 2011).

Outro gene na RGD a ser considerado é o *Crhr2*, uma vez que é expresso em neurônios espinhosos médios DRD1 (do subtipo E) no NAc (TRAN *et al.*, 2021). Esse gene codifica o receptor 2 do hormônio liberador de corticotropina (CHR) (CRHR2), um receptor presente na membrana plasmática acoplado à proteína G que é ativado pelo CRH e pela urocortina (IKEDA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2018). Embora menos estudado no NAc é um candidato importante que sugere que esses neurônios podem ser particularmente suscetíveis aos efeitos do CHR, o qual é liberado e medeia a resposta fisiológica e comportamental ao estresse, modulando vários sistemas de neurotransmissores, incluindo a liberação de DA (BONFIGLIO *et al.*, 2011; PAYER *et al.*, 2017). Tendo em vista que em distúrbios neuropsiquiátricos complexos (incluindo o TDAH e o TUS) as contribuições genéticas surgem de múltiplos genes de pequeno

efeito, futuros estudos fazem-se necessários para verificar uma possível atuação desses genes, de maneira individual ou coletiva, no estabelecimento da PLC e na modulação da atividade dos receptores DRD1, incluindo a análise da ultraestrutura e eletrofisiologia desses receptores, bem como os mecanismos de sinalização intracelular de neurônios associados a via direta do NAc desses animais.

Na caixa de atividade locomotora, o FEN foi capaz de diminuir a quantidade de bolos fecais em relação ao VEH quando testados aos 50 e 62 dias de idade (respectivamente, dose aguda e repetidas doses) em ambas as linhagens (Figura 39 e 41). Novamente um estudo utilizando d-anfetamina apresentou resultados similares. Um estudo avaliando a defecação por 30min em uma caixa de condicionamento operante em diferentes doses de d-anfetamina (0,32; 0,56; 1,0; 3,2; 5,6 mg/kg) demonstrou que ratos Sprague Dawley com 120 dias diminuíram a quantidade de produção de bolos fecais a partir de uma dose de 0,56 mg/kg (LESAGE *et al.*, 1994). No entanto, um outro estudo também avaliou a ação do FEN sobre a quantidade de bolos fecais. Rezin e colaboradores (2014) verificaram em um teste de CA de 5min que 2h após administrar uma elevada dose de FEN (12,5 mg/kg) em ratos Wistar machos (250 a 300 gramas) houve aumento da quantidade de bolos fecais em relação ao grupo controle. Em um estudo elegante Sachdev e Saharov (1998) verificaram que a administração subcutânea de antagonistas de ação central de DRD1 (SCH 23390) e de DRD2 (raclopride) induziram ao aumento da defecação, mas os agonistas de DRD1 (SKF 82958) e de DRD2 (quinpirole) não tiveram um efeito significativo sobre a defecação emocional demonstrando que outros mecanismos neuroquímicos podem estar conjuntamente envolvidos no mecanismo desse comportamento. Nesse sentido, segundo Sara e Deweer (1982), a diminuição da quantidade de bolos fecais em aparatos pode estar diretamente relacionada à menor quantidade de estresse.

Durante o período de 50 a 62 dias de vida dos animais (Experimento 5) nenhuma diferença de peso (Figura 42A), de ganho de peso (Figura 42B) e de consumo de ração (Figura 42A) e água (Figura 42B) foram observadas entre os diferentes grupos. Mattei e Carlini (1996) estudando os efeitos anorexígenos e comportamentais do FEN, observaram que ratas Wistar necessitam de doses elevadas de FEN (20 mg/kg) para um bloqueio completo da ingestão alimentar, enquanto ratos necessitam de doses menores (10 mg/kg). As pesquisadoras concluem que o FEN tem um efeito estimulante sobre o SNC, indicando uma ação sobre os sistemas dopaminérgicos, e que o organismo feminino parece apresentar

maior suscetibilidade aos efeitos centrais dessa substância. Em outro estudo Moreira e colaboradores (2005) ao estudarem a exposição ao FEN durante o desenvolvimento em camundongos fêmeas observaram que fêmeas prenhas que receberam FEN por gavagem (15 mg/kg) durante 14 dias não apresentaram diferença de peso, embora o tratamento com FEN tenha reduzido o peso do útero gravídico. Em relação a d-anfetamina tem sido verificado que doses elevadas (16-32 mg/kg, i.p.) são capazes de promover anorexia em ratos (LEWANDER *et al.*, 1971; MACPHAIL; GOLLUB, 1974). Em um estudo de Orsini e colaboradores (2014) observou-se que ratos tratados com d-anfetamina (3 mg/kg) durante 9 dias consecutivos que posteriormente deixaram de receber psicoestimulante ingeriram mais ração e aumentaram o peso durante os 30 dias subsequentes. Segundo os autores esse consumo posterior pode ser devido a sensibilização induzida por anfetaminas nos mecanismos de motivação e recompensa. Em humanos, foi relatado que a perda de peso promovida pelo uso de FEN ocorre de forma modesta e são necessários longos períodos de tratamento, por exemplo, foram observadas reduções de peso de 4,7 kg em média em um ano de uso, 3,8 kg em seis meses de uso e 1,55 kg em dois meses de uso (PAUMGARTTEN *et al.*, 2016). A este respeito, a Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos ordenou a retirada das autorizações de introdução no mercado de anorexígenos do tipo anfetamina, incluindo FEN, baseando a sua decisão na falta de eficiência dos anorexígenos do tipo anfetamina de acordo com o novo critério científico para a eficácia a longo prazo dos medicamentos antiobesidade (PAUMGARTTEN *et al.*, 2016). Além disso, o nosso presente trabalho encontrou que a administração de uma dose específica do FEN a curto prazo já é capaz de desenvolver efeitos comportamentais, hedônico e psicomotores, mesmo sem promover mudanças sobre a ingestão e a perda de peso que sustentem as alegações de que o FEN (e as anfetaminas) podem possuir um valor terapêutico seguro durante seu uso. E, conforme foi observado nas ratas das linhagens SHR e SLA16 fica visível que características genéticas distintas podem produzir efeitos comportamentais particulares durante o uso do FEN, o que serve de alerta em relação a possibilidade do desenvolvimento da TUS por anorexígenos do tipo anfetamina, bem como a possibilidade de comorbidade de acordo com a gravidade dos sintomas de transtornos neuropsiquiátricos.

6. CONCLUSÕES

Pela primeira vez demonstramos que o FEN é capaz de desenvolver PLC em ratos das linhagens SLA16 e SHR, sendo este último um modelo validado para o estudo da pesquisa básica de TDAH. Também mostramos que a linhagem SHR apresentou condicionamento tardio em relação à linhagem SLA16. Tomados em conjunto os testes de CA e caixa de atividade observamos que o FEN promoveu mudanças no comportamento emocional e motor de ambas as linhagens, onde a linhagem SLA16 demonstrou ser mais suscetível às alterações comportamentais ao FEN no CA, enquanto na caixa de atividade essa demonstrou maior índice de locomoção durante o tratamento de doses repetidas. Dentro do nosso delineamento experimental observamos que o FEN não foi capaz de modificar o peso dos animais, assim como o consumo de ração e água em ratos de ambas as linhagens, apesar de modificar a quantidade de bolos fecais no teste da caixa de atividade. Em relação aos receptores dopaminérgicos do NAc o FEN foi capaz de alterar a quantidade de TH e DRD2. E, apesar da quantidade de receptores DRD1 não modificarem sua após o uso de FEN, uma diferença basal entre as linhagens pode ser constatada.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante a execução desse trabalho foram vivenciados momentos extremamente duros para a ciência brasileira, à vida e para o nosso grupo de pesquisa. A pandemia carregou consigo limitações de convívio, mobilidade e, inclusive, de natureza técnica. Além disso, vivenciamos um momento de diminuição de investimentos na pesquisa e na educação, de negacionismo científico e de ataque à soberania de inúmeras instituições de ensino brasileiras. Essa falta de investimento repercutiu inclusive sobre a possibilidade de aquisição de recursos essenciais para a manutenção e funcionamento de laboratórios de pesquisa. Em nosso grupo do LGC/UFSC, esse conjunto de fatores testou-nos a resiliência e a capacidade de adaptação, sendo que para manter nossa mente sadia e em desenvolvimento, nos encontramos virtualmente, realizamos divulgação científica e escrevemos artigos de revisão e com dados antigos do LGC/UFSC. Apesar dessas questões, ficamos orgulhosos em poder apresentar um trabalho com dados inéditos e onde nossos questionamentos principais puderam ser contemplados, bem como gerar subsídios para o desenvolvimento de futuras pesquisas na área.

Com base nisso, ficam questionamentos que podem nortear futuras pesquisas no LGC/UFSC:

- Os genes *Crhr2*, *Tacr1* e *Npy* são igualmente expressos no NAc das linhagens SHR e SLA16?
- Os neurônios espinhosos médios do tipo DRD1 ou DRD2 no NAc possuem alterações morfológicas após tratamento crônico de FEN?
- Ocorre sensibilidade comportamental ao FEN após o tratamento crônico com FEN em linhagens de ratas SHR e SLA16?
- Ocorre autoadministração de FEN em ratas das linhagens SHR e SLA16?
- Os neurônios espinhosos médios do tipo DRD1 no NAc possuem diferença de sensibilidade devido aos seus mecanismos fisiológicos?

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 52, de 06 de outubro de 2011**. Dispõe sobre a proibição do uso das substâncias anfepramona, femproporex e mazindol, seus sais e isômeros. Publicada no Diário Oficial da União de 10 out. 2011.

ABRAHAMS, B. S. *et al.* Place conditioning with the dopamine D1-like receptor agonist SKF 82958 but not SKF 81297 or SKF 77434. **European Journal of Pharmacology**, v. 343, n. 2–3, p. 111–118, 19 Feb. 1998.

ACOSTA, M. T.; ARCOS-BURGOS, M.; MUENKE, M. Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): complex phenotype, simple genotype? **Genetics in Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2004.

ACUNA-GOYCOLEA, C. *et al.* Mechanisms of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide inhibition of identified green fluorescent protein-expressing GABA neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 32, p. 7406–7419, 10 Aug. 2005.

ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. **Behavioural Pharmacology**, v. 15, n. 5–6, p. 341–352, Sep. 2004.

AGARWAL, R. *et al.* The quality of life of adults with attention deficit hyperactivity disorder: a systematic review. **Innovations in clinical neuroscience**, v. 9, n. 5–6, p. 10–21, May 2012.

AGRAWAL, A.; LYNSKEY, M. T. Are there genetic influences on addiction: evidence from family, adoption and twin studies. **Addiction**, v. 103, n. 7, p. 1069–1081, Jul. 2008.

AITMAN, T. J. *et al.* Progress and prospects in rat genetics: a community view. **Nature Genetics**, v. 40, n. 5, p. 516–522, 1 May 2008.

AKIYAMA, K.; YABE, K.; SUTOO, D. Quantitative immunohistochemical distributions of tyrosine hydroxylase and calmodulin in the brains of spontaneously hypertensive rats. **The Kitasato archives of experimental medicine**, v. 65, n. 4, p. 199–208, Dec. 1992.

AL-EITAN, L. N. *et al.* Custom genotyping for substance addiction susceptibility genes in Jordanians of Arab descent. **BMC Research Notes**, v. 5, p. 497, 10 Sep. 2012.

ALMASY, L.; BLANGERO, J. Human QTL linkage mapping. **Genetica**, v. 136, n. 2, p. 333–340, Jun. 2009.

ALVAREZ FISCHER, D. *et al.* Sensitization to the behavioural effects of cocaine: alterations in tyrosine hydroxylase or endogenous opioid mRNAs are not necessarily involved. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 363, n. 3, p. 288–294, Mar. 2001.

AMARAL, R. A.; MALBERGIER, A.; ANDRADE, A. G. Manejo do paciente com transtornos relacionados ao uso de substância psicoativa na emergência psiquiátrica. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. suppl 2, p. S104–S111, Oct. 2010.

APA, AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)**. Ed 5, 2013.

ANDERSON, S. M.; SCHMIDT, H. D.; PIERCE, R. C. Administration of the D2 dopamine receptor antagonist sulpiride into the shell, but not the core, of the nucleus accumbens attenuates cocaine priming-induced reinstatement of drug seeking. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 7, p. 1452–1461, Jul. 2006.

ANJOS, P. A. R. *et al.* The influence of chromosome 4 on high ethanol consumption and blood pressure. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 102, p. 1–10, Aug. 2022.

ANSELMINI, M. *et al.* Genetic evidence for chromosome 4 loci influencing learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 131, p. 182–191, May 2016.

ANTONIOU, K. *et al.* D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 189–196, 1998.

ARIAS, A. J. *et al.* Correlates of co-occurring ADHD in drug-dependent subjects: prevalence and features of substance dependence and psychiatric disorders. **Addictive Behaviors**, v. 33, n. 9, p. 1199–1207, Sep. 2008.

ASPIDE, R. *et al.* Non-selective attention in a rat model of hyperactivity and attention deficit: subchronic methylphenidate and nitric oxide synthesis inhibitor treatment. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 1, p. 59–71, Jan. 2000.

ATTIÉ JR, M.; MEDEIROS-NETO, G. A. Administração de fenproporex sob a forma duplamente cega a pacientes com obesidade exógena: análise de resultados terapêuticos e efeitos no metabolismo lipídico. **Folha Med**, 64(4), 705-14. v. 64, n. 4, p. 705–714, 1972.

AUGUSTYNIAK, P. N. *et al.* Differential behavioral and neurochemical effects of cocaine after early exposure to methylphenidate in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 167, n. 2, p. 379–382, 28 Feb. 2006.

AZARBAD, L.; GONDER-FREDERICK, L. Obesity in women. **The Psychiatric Clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 423–440, Jun. 2010.

BACHMANN, C. J.; PHILIPSEN, A.; HOFFMANN, F. ADHD in Germany: trends in diagnosis and pharmacotherapy. **Deutsches Arzteblatt international**, v. 114, n. 9, p. 141–148, 3 Mar. 2017.

BAIK, J. H. Dopamine signaling in reward-related behaviors. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, p. 152, 11 Oct. 2013.

BAILEY, L. S. **Heritable Differences in Impulsive Behavior Associate with Altered Indices of Dopaminergic Transmission in the Nucleus Accumbens and Orbitofrontal Cortex**. Tese. State University of New York at Binghamton, 2023.

BALDO, B. A. *et al.* Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. **Behavioural Brain Research**, v. 137, n. 1–2, p. 165–177, 2 Dec. 2002.

BARDO, M. T. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 12, n. 1–2, p. 37–67, 1998.

BARDO, M. T.; BEVINS, R. A. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? **Psychopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 31–43, Dec. 2000.

BARDO, M. T.; ROWLETT, J. K.; HARRIS, M. J. Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 19, n. 1, p. 39–51, 1995.

BARDO, M. T.; VALONE, J. M.; BEVINS, R. A. Locomotion and conditioned place preference produced by acute intravenous amphetamine: role of dopamine receptors and individual differences in amphetamine self-administration. **Psychopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 39–46, Mar. 1999.

BARKLEY, R. A. *et al.* Young adult outcome of hyperactive children: adaptive functioning in major life activities. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 45, n. 2, p. 192–202, Feb. 2006.

BARNETT, S. A. **The rat: A study in behavior**. Routledge, 2017.

BARONEZA, J. E. *et al.* Avaliação toxicológica e reprodutiva de camundongos machos adultos tratados com femproporex. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 29, n. 2, 12 Mar. 2008.

BARR, J. L.; RENNER, K. J.; FORSTER, G. L. Withdrawal from chronic amphetamine produces persistent anxiety-like behavior but temporally-limited reductions in monoamines and neurogenesis in the adult rat dentate gyrus. **Neuropharmacology**, v. 59, n. 6, p. 395–405, Nov. 2010.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 182–217, Mar. 2011.

BECKER-KRAIL, D. D.; WALKER, W. H.; NELSON, R. J. The ventral tegmental area and nucleus accumbens as circadian oscillators: implications for drug abuse and substance use disorders. **Frontiers in physiology**, v. 13, p. 886704, 27 Apr. 2022.

BECKER, J. B.; PRENDERGAST, B. J.; LIANG, J. W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. **Biology of sex differences**, v. 7, p. 34, 26 Jul. 2016.

BECKETT, A. H.; SHENOY, E. V.; SALMON, J. A. The influence of replacement of the N-ethyl group by the cyanoethyl group on the absorption, distribution and metabolism of (plus or minus)-ethylamphetamine in man. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 194–202, Mar. 1972.

BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565–572, Jan. 2011.

BELIN, D. *et al.* High impulsivity predicts the switch to compulsive cocaine-taking. **Science**, v. 320, n. 5881, p. 1352–1355, 6 Jun. 2008.

BELIN, D. *et al.* High-novelty-preference rats are predisposed to compulsive cocaine self-administration. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 3, p. 569–579, Feb. 2011.

BELL, R. R. *et al.* A contemporaneous finding of fenproporex in a polydrug suicide. **Journal of analytical toxicology**, v. 25, n. 7, p. 652–656, Oct. 2001.

BENDERSKY, C. J. *et al.* Long-Term Impacts of Post-weaning Social Isolation on Nucleus Accumbens Function. **Frontiers in psychiatry**, v. 12, p. 745406, 20 Sep. 2021.

BENINGER, R. J.; MILLER, R. Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 2, p. 335–345, Mar. 1998.

BERMAN, S. M. *et al.* Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 2, p. 123–142, Feb. 2009.

BERRO, L. F. *et al.* Sleep deprivation precipitates the development of amphetamine-induced conditioned place preference in rats. **Neuroscience Letters**, v. 671, p. 29–32, 3 Apr. 2018.

BEVINS, R. A.; KLEBAUR, J. E.; BARDO, M. T. Individual differences in response to novelty, amphetamine-induced activity and drug discrimination in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 8, n. 2–3, p. 113–123, Jun. 1997a.

BEVINS, R. A.; KLEBAUR, J. E.; BARDO, M. T. 7-OH-DPAT has d-amphetamine-like discriminative stimulus properties. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 58, n. 2, p. 485–490, Oct. 1997b.

BIEDERMAN, J. *et al.* Psychoactive substance use disorders in adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): effects of ADHD and psychiatric comorbidity. **The American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 11, p. 1652–1658, Nov. 1995.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S. V. Attention-deficit hyperactivity disorder. **The Lancet**, v. 366, n. 9481, p. 237–248, 22 Jul. 2005.

BIEDERMAN, J.; MICK, E.; FARAONE, S. V. Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and

symptom type. **The American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 5, p. 816–818, May 2000.

BLOMELEY, C.; BRACCI, E. Substance P depolarizes striatal projection neurons and facilitates their glutamatergic inputs. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 8, p. 2143–2155, 15 Apr. 2008.

BLOMELEY, C. P.; KEHOE, L. A.; BRACCI, E. Substance P mediates excitatory interactions between striatal projection neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 15, p. 4953–4963, 15 Apr. 2009.

BOBB, A. J. *et al.* Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. **American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics**, v. 134B, n. 1, p. 67–72, 5 Apr. 2005.

BONFIGLIO, J. J. *et al.* The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. **Neuroendocrinology**, v. 94, n. 1, p. 12–20, 13 May 2011.

BOUTARI, C.; MANTZOROS, C. S. A 2022 update on the epidemiology of obesity and a call to action: as its twin COVID-19 pandemic appears to be receding, the obesity and dysmetabolism pandemic continues to rage on. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 133, p. 155217, Aug. 2022.

BOYLE, C. A. *et al.* Trends in the prevalence of developmental disabilities in US children, 1997–2008. **Pediatrics**, v. 127, n. 6, p. 1034–1042, Jun. 2011.

BOZARTH, M. A. Neuroanatomical boundaries of the reward-relevant opiate-receptor field in the ventral tegmental area as mapped by the conditioned place preference method in rats. **Brain Research**, v. 414, n. 1, p. 77–84, 23 Jun. 1987.

BRASIL. Presidência da República. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. **I Levantamento Nacional sobre o Uso de Álcool, Tabaco e Outras Drogas entre Universitários das 27 Capitais Brasileiras** / Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas; GREA/IPQ-HC/FMUSP. Organização de Arthur Guerra de Andrade; Paulina do Carmo Arruda Vieira Duarte; Lúcio Garcia de Oliveira, Brasília, 2010a. 284p.

BRASIL. **Lei nº 13.454 de 23 de junho de 2017**. Autoriza a produção, a comercialização e o consumo, sob prescrição médica, dos anorexígenos sibutramina, anfepramona, femproporex e mazindol. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 Jun. 2017.

BRAY, G. A. Drug treatment of obesity. **Bailliere's best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 13, n. 1, p. 131–148, Apr. 1999.

BRYDA, E. C. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. **Missouri Medicine**, v. 110, n. 3, p. 207–211, Jun. 2013.

BURKE, A. R.; WATT, M. J.; FORSTER, G. L. Adolescent social defeat increases adult amphetamine conditioned place preference and alters D2 dopamine receptor expression. **Neuroscience**, v. 197, p. 269–279, 1 Dec. 2011.

CAINE, S. B. *et al.* Lack of self-administration of cocaine in dopamine D1 receptor knock-out mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 48, p. 13140–13150, 28 Nov. 2007.

CALZAVARA, M. B. *et al.* Effects of antipsychotics and amphetamine on social behaviors in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 1, p. 15–22, 20 Nov. 2011.

CANCELIER, K. *et al.* Omega-3 Fatty Acids and Mood Stabilizers Alter Behavioural and Energy Metabolism Parameters in Animals Subjected to an Animal Model of Mania Induced by Fenproporex. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 6, p. 3935–3947, Aug. 2017.

CARBONI, E. *et al.* Effect of amphetamine, cocaine and depolarization by high potassium on extracellular dopamine in the nucleus accumbens shell of SHR rats. An in vivo microdialysis study. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 7, p. 653–659, Nov. 2003.

CARDO JALÓN, E. *et al.* Influencia de los diferentes criterios diagnósticos y la cultura en la prevalencia del trastorno por déficit de atención/hiperactividad. **Revista de Neurología**, v. 52, n. S01, p. S109, 2011.

CAREY, M. P. *et al.* Differential distribution, affinity and plasticity of dopamine D-1 and D-2 receptors in the target sites of the mesolimbic system in an animal model of ADHD. **Behavioural Brain Research**, v. 94, n. 1, p. 173–185, Jul. 1998.

CARNEIRO, M. DE F. G.; GUERRA, A. A.; ACURCIO, F. DE A. Prescription, dispensing, and regulation of psychoactive anorexigenic drugs in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 8, p. 1763–1772, Aug. 2008.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193–1205, 9 Aug. 2005.

CARR, G. D.; PHILLIPS, A. G.; FIBIGER, H. C. Independence of amphetamine reward from locomotor stimulation demonstrated by conditioned place preference. **Psychopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 221–226, 1988.

CARR, G. D.; WHITE, N. M. Conditioned place preference from intra-accumbens but not intra-caudate amphetamine injections. **Life Sciences**, v. 33, n. 25, p. 2551–2557, Dec. 1983.

CARR, L. G. *et al.* Identification of candidate genes for alcohol preference by expression profiling of congenic rat strains. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 31, n. 7, p. 1089–1098, Jul. 2007.

CARROLL, K. M.; ROUNSAVILLE, B. J. History and significance of childhood attention deficit disorder in treatment-seeking cocaine abusers. **Comprehensive Psychiatry**, v. 34, n. 2, p. 75–82, 1993.

CARTONI, E.; BALLEINE, B.; BALDASSARRE, G. Appetitive Pavlovian-instrumental Transfer: A review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 71, p. 829–848, Dec. 2016.

CASEY, B. J.; GETZ, S.; GALVAN, A. The adolescent brain. **Developmental review: DR**, v. 28, n. 1, p. 62–77, 2008.

CASTELLANOS, F. X.; TANNOCK, R. Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 8, p. 617–628, Aug. 2002.

CHADMAN, K. K.; YANG, M.; CRAWLEY, J. N. Criteria for validating mouse models of psychiatric diseases. **American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics**, v. 150B, n. 1, p. 1–11, 5 Jan. 2009.

CHAMBERS, R. A.; TAYLOR, J. R.; POTENZA, M. N. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. **The American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 6, p. 1041–1052, Jun. 2003.

CHARACH, A. *et al.* Childhood attention-deficit/hyperactivity disorder and future substance use disorders: comparative meta-analyses. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 50, n. 1, p. 9–21, Jan. 2011.

CHAUHAN, A. *et al.* Burden of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) in Indian Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 89, n. 6, p. 570–578, Jun. 2022.

CHE, Y. *et al.* Abstinence from repeated amphetamine treatment induces depressive-like behaviors and oxidative damage in rat brain. **Psychopharmacology**, v. 227, n. 4, p. 605–614, Jun. 2013.

CHEN, J.-C.; CHEN, P.-C.; CHIANG, Y.-C. Molecular mechanisms of psychostimulant addiction. **Chang Gung Medical Journal**, v. 32, n. 2, p. 148–154, Apr. 2009.

CHILDS, E.; DE WIT, H. Amphetamine-induced place preference in humans. **Biological Psychiatry**, v. 65, n. 10, p. 900–904, 15 May 2009.

CHIU, P. *et al.* Enhanced [³H]spiroperidol binding in striatum of spontaneously hypertensive rat (SHR). **European Journal of Pharmacology**, v. 82, n. 3–4, p. 243–244, 27 Aug. 1982.

CHIU, P. *et al.* Differential changes in central serotonin and dopamine receptors in spontaneous hypertensive rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 8, n. 4–6, p. 665–668, 1984.

CHOLERIS, E. *et al.* A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235–260, May 2001.

CLAVENNA, A.; BONATI, M. Safety of medicines used for ADHD in children: a review of published prospective clinical trials. **Archives of Disease in Childhood**, v. 99, n. 9, p. 866–872, Sep. 2014.

CODY, J. T.; VALTIER, S. Detection of amphetamine following administration of fenproporex. **Journal of analytical toxicology**, v. 20, n. 6, p. 425–431, Oct. 1996.

CODY, J. T.; VALTIER, S.; STILLMAN, S. Amphetamine and fenproporex levels following multidose administration of fenproporex. **Journal of analytical toxicology**, v. 23, n. 3, p. 187–194, Jun. 1999.

COHEN, P. A. Imported fenproporex-based diet pills from Brazil: a report of two cases. **Journal of General Internal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 430–433, Mar. 2009.

COMINGS, D. E. *et al.* Studies of the potential role of the dopamine D1 receptor gene in addictive behaviors. **Molecular Psychiatry**, v. 2, n. 1, p. 44–56, Jan. 1997.

COMIRAN, E. *et al.* Fenproporex and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid after controlled oral administration of fenproporex. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 34, n. 5, p. 545–553, Oct. 2012.

COMPTON, D. R.; JOHNSON, K. M. Effects of acute and chronic clozapine and haloperidol on in vitro release of acetylcholine and dopamine from striatum and nucleus accumbens. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 248, n. 2, p. 521–530, Feb. 1989.

CONCEIÇÃO, C. Q. *et al.* Behavioral cross-sensitization between testosterone and fenproporex in adolescent and adult rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 1, p. e6388, 17 Nov. 2017.

CORTESE, S. The neurobiology and genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): what every clinician should know. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 16, n. 5, p. 422–433, Sep. 2012.

COSTA, T. O. *et al.* TDAH as a risk factor for the use of drugs of abuse: a literature review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 52229–52242, 25 May 2021.

COUTTS, R. T. *et al.* Metabolism and disposition of N-(2-cyanoethyl)amphetamine (fenproporex) and amphetamine: study in the rat brain. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 64, n. 6, p. 724–728, Jun. 1986.

CROLS, R. *et al.* Transient ischemic attacks associated with amfepramone therapy: a case report. **Functional neurology**, v. 8, n. 5, p. 351–354, Oct. 1993.

CUNHA, T. M. DE M. DA *et al.* Riscos e efeitos colaterais do uso de anorexígenos em mulheres no estado de São Paulo. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e62101321005, 4 Oct. 2021.

DALRYMPLE, R. A. *et al.* NICE guideline review: Attention deficit hyperactivity disorder: diagnosis and management (NG87). **Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition**, v. 105, n. 5, p. 289–293, Oct. 2020.

DANIELSON, M. L. *et al.* Prevalence of Parent-Reported ADHD Diagnosis and Associated Treatment Among U.S. Children and Adolescents, 2016. **Journal of Clinical Child and Adolescent Psychology**, v. 47, n. 2, p. 199–212, 24 Jan. 2018.

DAUBNER, S. C.; LE, T.; WANG, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, n. 1, p. 1–12, 1 Apr. 2011.

DE BRUIN, N. M. W. J. *et al.* Combined uridine and choline administration improves cognitive deficits in spontaneously hypertensive rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 1, p. 63–79, Jul. 2003.

DE DEURWAERDÈRE, P. *et al.* Cannabinoid 1/2 Receptor Activation Induces Strain-Dependent Behavioral and Neurochemical Changes in Genetic Absence Epilepsy Rats From Strasbourg and Non-epileptic Control Rats. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, p. 886033, 23 May 2022.

DE MEDEIROS, G. F. *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.

DEAK, J. D. *et al.* Effects of common and rare chromosome 4 gabaergic gene variation on alcohol use and antisocial behavior. **Journal of Studies on Alcohol and Drugs**, v. 80, n. 6, p. 585–593, Nov. 2019.

DEGENHARDT, L. *et al.* Global burden of disease attributable to illicit drug use and dependence: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 382, n. 9904, p. 1564–1574, 9 Nov. 2013.

DEGENHARDT, L. *et al.* The increasing global health priority of substance use in young people. **The Lancet. Psychiatry**, v. 3, n. 3, p. 251–264, Mar. 2016.

DELA PEÑA, I. *et al.* Gene expression profiling in the striatum of amphetamine-treated spontaneously hypertensive rats which showed amphetamine conditioned place preference and self-administration. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 5, p. 865–875, 2015.

DELA PEÑA, I. C. *et al.* Methylphenidate self-administration and conditioned place preference in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: the spontaneously hypertensive rat. **Behavioural Pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 31–39, Feb. 2011.

DEMONTIS, D. *et al.* Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. **Nature Genetics**, v. 51, n. 1, p. 63–75, Jan. 2019.

DI CIANO, P.; BLAHA, C. D.; PHILLIPS, A. G. Changes in dopamine efflux associated with extinction, CS-induced and d-amphetamine-induced reinstatement of

drug-seeking behavior by rats. **Behavioural Brain Research**, v. 120, n. 2, p. 147–158, May 2001.

DICK, D. M.; AGRAWAL, A. The genetics of alcohol and other drug dependence. **Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 31, n. 2, p. 111–118, 2008.

DIEHL, A.; CORDEIRO, D. C.; LARANJEIRA, R. **Dependência Química: Prevenção, Tratamento e Políticas Públicas**. 2nd. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018. v. 1p. 2077

DIETZ, D. M. *et al.* Dopamine transporter, but not tyrosine hydroxylase, may be implicated in determining individual differences in behavioral sensitization to amphetamine. **Physiology & Behavior**, v. 86, n. 3, p. 347–355, 15 Oct. 2005.

DILULLO, S. L.; MARTIN-IVERSON, M. T. Evidence for presynaptic dopamine mechanisms underlying amphetamine-conditioned locomotion. **Brain Research**, v. 578, n. 1–2, p. 161–167, 24 Apr. 1992.

DREHER, J. K.; JACKSON, D. M. Role of D1 and D2 dopamine receptors in mediating locomotor activity elicited from the nucleus accumbens of rats. **Brain Research**, v. 487, n. 2, p. 267–277, 22 May 1989.

DREVETS, W. C. *et al.* Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 2, p. 81–96, 15 Jan. 2001.

DUARTE, F. S. *et al.* Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety? **Psychopharmacology**, v. 227, n. 2, p. 209–219, May 2013.

DUARTE-NEVES, J.; PEREIRA DE ALMEIDA, L.; CAVADAS, C. Neuropeptide Y (NPY) as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 95, p. 210–224, Nov. 2016.

DUVAUCHELLE, C. L. *et al.* Effects of cocaine context on NAcc dopamine and behavioral activity after repeated intravenous cocaine administration. **Brain Research**, v. 862, n. 1–2, p. 49–58, 17 Apr. 2000.

DUVAUCHELLE, C. L.; IKEGAMI, A.; CASTANEDA, E. Conditioned increases in behavioral activity and accumbens dopamine levels produced by intravenous cocaine. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 6, p. 1156–1166, Dec. 2000.

ENOCH, M. A. *et al.* GABAergic gene expression in postmortem hippocampus from alcoholics and cocaine addicts; corresponding findings in alcohol-naïve P and NP rats. **Plos One**, v. 7, n. 1, p. e29369, 13 Jan. 2012.

ESSMAN, W. D.; MCGONIGLE, P.; LUCKI, I. Anatomical differentiation within the nucleus accumbens of the locomotor stimulatory actions of selective dopamine agonists and d-amphetamine. **Psychopharmacology**, v. 112, n. 2–3, p. 233–241, 1993.

EVA, C. *et al.* Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 27, n. 3, p. 308–339, 20 Sep. 2006.

EVERITT, B. J. *et al.* Review. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 363, n. 1507, p. 3125–3135, 12 Oct. 2008.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 1481–1489, Nov. 2005.

FADANNI, G. P. **Efeitos comportamentais e neuroquímicos induzidos pela injeção bilateral de 6-hidroxidopamina no estriado de ratos das linhagens SRH e SLA16**. TESE: UFSC, 2018.

FAN, X.; BRUNO, K. J.; HESS, E. J. Rodent models of ADHD. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 9, p. 273–300, 2012.

FARAONE, S. V. *et al.* The World Federation of ADHD International Consensus Statement: 208 Evidence-based conclusions about the disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 128, p. 789–818, Sep. 2021.

FAYYAD, J. *et al.* The descriptive epidemiology of DSM-IV Adult ADHD in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **Attention deficit and hyperactivity disorders**, v. 9, n. 1, p. 47–65, Mar. 2017.

FELTRIN, A. C. *et al.* Medicamentos Anorexígenos - panorama da dispensação em farmácias comerciais de Santa Maria (RS). **Saúde (Santa Maria)**, v. 35, n. 1, p. 46, 3 Jul. 2009.

FIELD, A. E. *et al.* Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, n. 13, p. 1581–1586, 9 Jul. 2001.

FLETCHER, P. J. *et al.* Injections of D-amphetamine into the ventral pallidum increase locomotor activity and responding for conditioned reward: a comparison with injections into the nucleus accumbens. **Brain Research**, v. 805, n. 1–2, p. 29–40, 14 Sep. 1998.

FONTANA, R. DA S. *et al.* [ADHD prevalence in four Brazilian public schools]. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 65, n. 1, p. 134–137, Mar. 2007.

FRANCIS, T. C. *et al.* High-Frequency Activation of Nucleus Accumbens D1-MSNs Drives Excitatory Potentiation on D2-MSNs. **Neuron**, v. 103, n. 3, p. 432–444.e3, 7 Aug. 2019.

FRAZIER, T. W. *et al.* ADHD and achievement: meta-analysis of the child, adolescent, and adult literatures and a concomitant study with college students. **Journal of Learning Disabilities**, v. 40, n. 1, p. 49–65, Feb. 2007.

FREIRE, A. C. C.; PONDE, M. P. A pilot study of prevalence of hyperactivity and attention deficit disorder in scholar children in Salvador, Bahia, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 2B, p. 474–478, Jun. 2005.

FUJITA, S. *et al.* Altered pre- and postsynaptic dopamine receptor functions in spontaneously hypertensive rat: an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal of oral science**, v. 45, n. 2, p. 75–83, Jun. 2003.

FUJITA, S. *et al.* Decreased postsynaptic dopaminergic and cholinergic functions in the ventrolateral striatum of spontaneously hypertensive rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 484, n. 1, p. 75–82, 19 Jan. 2004.

FULLER, R. W. *et al.* Altered behavioral response to a D2 agonist, LY141865, in spontaneously hypertensive rats exhibiting biochemical and endocrine responses similar to those in normotensive rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 227, n. 2, p. 354–359, Nov. 1983.

FURMAN, L. What is attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD)? **Journal of Child Neurology**, v. 20, n. 12, p. 994–1002, Dec. 2005.

GADDE, K. M. *et al.* Obesity: Pathophysiology and Management. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 71, n. 1, p. 69–84, 2 Jan. 2018.

GANGAROSSA, G. *et al.* Distribution and compartmental organization of GABAergic medium-sized spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, p. 22, 19 Feb. 2013.

GENRO, J. P. *et al.* Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 10, n. 4, p. 587–601, Apr. 2010.

GHANIZADEH, A. Agreement between Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, and the proposed DSM-V attention deficit hyperactivity disorder diagnostic criteria: an exploratory study. **Comprehensive Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 7–10, Jan. 2013.

GIBBS, R. A. *et al.* Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 493–521, 1 Apr. 2004.

GIGLIOTTI, A.; GUIMARÃES, A. **Adição, Dependência, Compulsão e Impulsividade**. 1st. ed. Rio de Janeiro: RUBIO, 2017. v. 1p. 420

GLIMCHER, P. W. *et al.* Endogenous opiate reward induced by an enkephalinase inhibitor, thiorphan, injected into the ventral midbrain. **Behavioral Neuroscience**, v. 98, n. 2, p. 262–268, Apr. 1984.

GOMES, L. M. *et al.* Omega-3 fatty acids and mood stabilizers alter behavioral and oxidative stress parameters in animals subjected to fenproporex administration. **Metabolic brain disease**, v. 32, n. 2, p. 519–528, Apr. 2017.

GONÇALVES, C. L. *et al.* Effects of acute and chronic administration of fenproporex on DNA damage parameters in young and adult rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 380, n. 1–2, p. 171–176, Aug. 2013.

GONÇALVES, C. L. *et al.* Effects of chronic administration of fenproporex on cognitive and non-cognitive behaviors. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 2, p. 583–588, Apr. 2015.

GORE, B. B.; ZWEIFEL, L. S. Genetic reconstruction of dopamine D1 receptor signaling in the nucleus accumbens facilitates natural and drug reward responses. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 20, p. 8640–8649, 15 May 2013.

GOTO, Y.; OTANI, S.; GRACE, A. A. The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 5, p. 583–587, Oct. 2007.

GRACE, A. A. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. **Neuroscience**, v. 41, n. 1, p. 1–24, 1991.

GRACE, A. A.; ONN, S. P. Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. **The Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 10, p. 3463–3481, Oct. 1989.

GRAEFF, R. L.; VAZ, C. E. Avaliação e diagnóstico do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). **Psicologia USP**, v. 19, n. 3, p. 341–361, Sep. 2008.

|\, P.; ALLEN, P. B.; NAIRN, A. C. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. **Neuron**, v. 23, n. 3, p. 435–447, Jul. 1999.

GREVET, E. H. *et al.* Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 256, n. 5, p. 311–319, Aug. 2006.

GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 545–552, Jul. 2004.

GUARDIOLA, A.; FUCHS, F. D.; ROTTA, N. T. Prevalence of attention-deficit hyperactivity disorders in students. Comparison between DSM-IV and neuropsychological criteria. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 58, n. 2B, p. 401–407, Jun. 2000.

GUERRIERO, R. M. *et al.* Preadolescent methylphenidate versus cocaine treatment differ in the expression of cocaine-induced locomotor sensitization during adolescence and adulthood. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 11, p. 1171–1180, 1 Dec. 2006.

GUINDALINI, C. *et al.* A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 12, p. 4552–4557, 21 Mar. 2006.

HADLER, A. J. Mazindol, a new non-amphetamine anorexigenic agent. **The Journal of clinical pharmacology and new drugs**, v. 12, n. 11, p. 453–458, Dec. 1972.

HALEEM, D. J. *et al.* Dopamine and serotonin neurotransmission in the reinforcing effects of alcohol and apomorphine. **Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan**, v. 15, n. 8, p. 458–462, Aug. 2005.

HALL, C. S. Drive and emotionality: factors associated with adjustment in the rat. **Journal of Comparative Psychology**, v. 17, n. 1, p. 89–108, Feb. 1934.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1–5, Aug. 1984.

HÄRFSTRAND, A.; FREDHOLM, B.; FUXE, K. Inhibitory effects of neuropeptide Y on cyclic AMP accumulation in slices of the nucleus tractus solitarius region of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 76, n. 2, p. 185–190, 6 May 1987.

HARVEY, R. C. *et al.* Methylphenidate treatment in adolescent rats with an attention deficit/hyperactivity disorder phenotype: cocaine addiction vulnerability and dopamine transporter function. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 837–847, Mar. 2011.

HEAL, D. J. *et al.* New perspectives from microdialysis studies in freely-moving, spontaneously hypertensive rats on the pharmacology of drugs for the treatment of ADHD. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 90, n. 2, p. 184–197, Aug. 2008.

HEFFNER, T. G.; HARTMAN, J. A.; SEIDEN, L. S. A rapid method for the regional dissection of the rat brain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 3, p. 453–456, 1 Sep. 1980.

HENDLEY, E. D.; OHLSSON, W. G. Two new inbred rat strains derived from SHR: WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats. **The American Journal of Physiology**, v. 261, n. 2 Pt 2, p. H583-9, Aug. 1991.

HENNIN, K.; WIENS, A.; SANCHES, A. C. C. Estudo das prescrições de anorexígenos dispensados em uma farmácia com manipulação de Cascavel-PR. **Valuation Studies**, v. 12, n. 2, 31 Dec. 2011.

HERZOG, H. *et al.* Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 13, p. 5794–5798, 1 Jul. 1992.

HEYMSFIELD, S. B.; WADDEN, T. A. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 3, p. 254–266, 19 Jan. 2017.

HIKIDA, T. *et al.* Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. **Neuron**, v. 66, n. 6, p. 896–907, 24 Jun. 2010.

HIROI, N.; WHITE, N. M. The amphetamine conditioned place preference: differential involvement of dopamine receptor subtypes and two dopaminergic terminal areas. **Brain Research**, v. 552, n. 1, p. 141–152, 21 Jun. 1991.

HOFFMAN, D. C.; BENINGER, R. J. Selective D1 and D2 dopamine agonists produce opposing effects in place conditioning but not in conditioned taste aversion learning. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 31, n. 1, p. 1–8, Sep. 1988.

HOFFMAN, D. C.; BENINGER, R. J. The effects of selective dopamine D1 or D2 receptor antagonists on the establishment of agonist-induced place conditioning in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 33, n. 2, p. 273–279, Jun. 1989.

HOFFMEISTER, M. C. *et al.* A importância da avaliação dos riscos do uso demetilfenidato durante a gestação. **HCPA**, v. 33, 1 Jan. 2013.

HOOKS, M. S. *et al.* Individual differences in amphetamine sensitization: dose-dependent effects. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 41, n. 1, p. 203–210, Jan. 1992.

HOTCHKISS, A.; GIBB, J. W. Blockade of methamphetamine-induced depression of tyrosine hydroxylase by GABA transaminase inhibitors. **European Journal of Pharmacology**, v. 66, n. 2–3, p. 201–205, 29 Aug. 1980.

HURST, T. World Drug Report. In: BERNAT, F. P.; FRAILING, K. **The encyclopedia of women and crime**. Wiley, 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar: 2019**. Rio de Janeiro: IBGE, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/educacao/9134-pesquisa-nacional-de-saude-do-escolar.html?edicao=34256&t=resultados>

IKEDA, K. *et al.* Expression of urocortin I in normal tissues and malignant tumors. **Cancer cell & microenvironment**, 16 Jun. 2014.

IKEMOTO, S. Ventral striatal anatomy of locomotor activity induced by cocaine, D-amphetamine, dopamine and D1/D2 agonists. **Neuroscience**, v. 113, n. 4, p. 939–955, 2002.

IKEMOTO, S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 2, p. 129–150, Nov. 2010.

IVANOV, I. *et al.* Sensitization-based risk for substance abuse in vulnerable individuals with ADHD: Review and re-examination of evidence. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 135, p. 104575, Apr. 2022.

IZÍDIO, G. S. *et al.* Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 4, n. 7, p. 412–419, Oct. 2005.

IZÍDIO, G. S. *et al.* The influence of sex and estrous cycle on QTL for emotionality and ethanol consumption. **Mammalian Genome**, v. 22, n. 5–6, p. 329–340, Jun. 2011.

IZÍDIO, G. S.; SPRICIGO, L.; RAMOS, A. Genetic differences in the elevated plus-maze persist after first exposure of inbred rats to the test apparatus. **Behavioural Processes**, v. 68, n. 2, p. 129–134, 28 Feb. 2005.

JACOB, H. J. Functional genomics and rat models. **Genome Research**, v. 9, n. 11, p. 1013–1016, Nov. 1999.

JANENAITE, E. *et al.* Potential role of tyrosine hydroxylase in the loss of psychostimulant effect of amphetamine under conditions of impaired dopamine transporter activity. **Behavioural Brain Research**, v. 334, p. 105–108, 15 Sep. 2017.

JENTSCH, J. D. Impaired visuospatial divided attention in the spontaneously hypertensive rat. **Behavioural Brain Research**, v. 157, n. 2, p. 323–330, 28 Feb. 2005.

JOHANSEN, E. B. *et al.* The dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): Present status and future perspectives. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 28, n. 03, Jun. 2005.

JOSSELYN, S. A.; BENINGER, R. J. Neuropeptide Y: intraaccumbens injections produce a place preference that is blocked by cis-flupenthixol. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 46, n. 3, p. 543–552, Nov. 1993.

KAI, N. *et al.* Differential roles of dopamine D1 and D2 receptor-containing neurons of the nucleus accumbens shell in behavioral sensitization. **Journal of Neurochemistry**, v. 135, n. 6, p. 1232–1241, Dec. 2015.

KALIVAS, P. W.; SORG, B. A.; HOOKS, M. S. The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. **Behavioural Pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 315–334, 1993.

KELLY, P. H. Drug-Induced Motor Behavior. In: IVERSEN, L. L.; IVERSEN, S. D.; SNYDER, S. H. (Eds.). **Drugs, neurotransmitters, and behavior**. Boston, MA: Springer US, 1977. p. 295–331.

KHROYAN, T. V. *et al.* Behavioral interactions produced by co-administration of 7-OH-DPAT with cocaine or apomorphine in the rat. **Psychopharmacology**, v. 142, n. 4, p. 383–392, Mar. 1999.

KIM, J. H. *et al.* Environmental risk factors, protective factors, and peripheral biomarkers for ADHD: an umbrella review. **The Lancet. Psychiatry**, v. 7, n. 11, p. 955–970, Nov. 2020.

KIRBY, R. F. *et al.* Cardiovascular and sympathetic nervous system responses to an acute stressor in borderline hypertensive rats (BHR). **Physiology & Behavior**, v. 46, n. 2, p. 309–313, Aug. 1989.

KIROUAC, G. J.; GANGULY, P. K. Up-regulation of dopamine receptors in the brain of the spontaneously hypertensive rat: an autoradiographic analysis. **Neuroscience**, v. 52, n. 1, p. 135–141, Jan. 1993a.

KIROUAC, G. J.; GANGULY, P. K. Cholecystokinin receptor density in the striatum of the spontaneously hypertensive rat. **Brain Research**, v. 604, n. 1–2, p. 338–341, 26 Feb. 1993b.

KLEBAUR, J. E. *et al.* Individual differences in behavioral responses to novelty and amphetamine self-administration in male and female rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 12, n. 4, p. 267–275, Jul. 2001.

KOK, F. M. *et al.* The female side of pharmacotherapy for ADHD-A systematic literature review. **Plos One**, v. 15, n. 9, p. e0239257, 18 Sep. 2020.

KOLTA, M. G. *et al.* Time course of the development of the enhanced behavioral and biochemical responses to amphetamine after pretreatment with amphetamine. **Neuropharmacology**, v. 24, n. 9, p. 823–829, Sep. 1985.

KOOB, G. F. *et al.* Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 8, p. 739–749, Jan. 2004.

KOOB, G. F.; ARENDS, M. A.; LE MOAL, M. **Drugs, addiction, and the brain**. Elsevier, 2014.

KOOIJ, J. J. S. *et al.* Distinguishing comorbidity and successful management of adult ADHD. **Journal of attention disorders**, v. 16, n. 5 Suppl, p. 3S-19S, Jul. 2012.

KRAEMER, T. *et al.* Studies on the metabolism and toxicological detection of the amphetamine-like anorectic fenproporex in human urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v. 738, n. 1, p. 107–118, 28 Jan. 2000.

KRAEMER, T. *et al.* Fenproporex N-dealkylation to amphetamine--enantioselective in vitro studies in human liver microsomes as well as enantioselective in vivo studies in Wistar and Dark Agouti rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 947–957, 1 Sep. 2004.

KRAMER, P. F. *et al.* Dopamine D2 receptor overexpression alters behavior and physiology in Drd2-EGFP mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 126–132, 5 Jan. 2011.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The protein protocols handbook**. Springer Protocols Handbooks. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. p. 17–24.

KUPCHIK, Y. M. *et al.* Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 1230–1232, Sep. 2015.

LAMBEZ, B. *et al.* Non-pharmacological interventions for cognitive difficulties in ADHD: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Psychiatric Research**, v. 120, p. 40–55, Jan. 2020.

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 and hyperactivity disorders**, v. 3, n. 1, p. 1–12, Mar. 2011.

LAVIOLETTE, S. R.; VAN DER KOOY, D. The motivational valence of nicotine in the rat ventral tegmental area is switched from rewarding to aversive following blockade of the alpha7-subunit-containing nicotinic acetylcholine receptor. **Psychopharmacology**, v. 166, n. 3, p. 306–313, Mar. 2003.

LE FOLL, B. *et al.* Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review. **Behavioural Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 1–17, Feb. 2009.

LEÃO, A. H. F. F. *et al.* Changes in the mesocorticolimbic pathway after low dose reserpine-treatment in Wistar and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): Implications for cognitive deficits in a progressive animal model for Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 410, p. 113349, 23 Jul. 2021.

LEE, N. K. *et al.* Pharmacotherapy for amphetamine dependence: A systematic review. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 191, p. 309–337, 1 Oct. 2018.

LEE, S. S. *et al.* Prospective association of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and substance use and abuse/dependence: a meta-analytic review. **Clinical Psychology Review**, v. 31, n. 3, p. 328–341, Apr. 2011.

LEFFA, D. T.; CAYE, A.; ROHDE, L. A. ADHD in children and adults: diagnosis and prognosis. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 57, p. 1–18, 2022.

LENZ, M.; RICHTER, T.; MÜHLHAUSER, I. The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood: a systematic review. **Deutsches Arzteblatt international**, v. 106, n. 40, p. 641–648, 2 Oct. 2009.

LEO, D. *et al.* Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 7, p. 661–669, Nov. 2003.

LEONARD, B. E. *et al.* Methylphenidate: a review of its neuropharmacological, neuropsychological and adverse clinical effects. **Human Psychopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 151–180, Apr. 2004.

LEONE, P.; DI CHIARA, G. Blockade of D-1 receptors by SCH 23390 antagonizes morphine- and amphetamine-induced place preference conditioning. **European Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 2, p. 251–254, 17 Mar. 1987.

LESAGE, M. *et al.* The effects of d-amphetamine and diazepam on schedule-induced defecation in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 48, n. 3, p. 787–790, Jul. 1994.

LEVIN, F. R. *et al.* Extended-Release Mixed Amphetamine Salts vs Placebo for Comorbid Adult Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Cocaine Use Disorder: A Randomized Clinical Trial. **JAMA psychiatry**, v. 72, n. 6, p. 593–602, Jun. 2015.

LEVY, S. *et al.* Childhood ADHD and risk for substance dependence in adulthood: a longitudinal, population-based study. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. e105640, 27 Aug. 2014.

LEWANDER, T. A mechanism for the development of tolerance to amphetamine in rats. **Psychopharmacologia**, v. 21, n. 1, p. 17–31, 1971.

LIANG, T. *et al.* Glutathione S-transferase 8-8 expression is lower in alcohol-preferring than in alcohol-nonpreferring rats. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 28, n. 11, p. 1622–1628, Nov. 2004.

LIM, D. K. *et al.* Comparative studies of muscarinic and dopamine receptors in three strains of rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 2–3, p. 279–287, 20 Jun. 1989.

LINTHORST, A. C. *et al.* Electrically stimulated [3H]dopamine and [14C]acetylcholine release from nucleus caudatus slices: differences between spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. **Brain Research**, v. 509, n. 2, p. 266–272, 19 Feb. 1990.

LINTHORST, A. C. *et al.* Effect of the dopamine D2 receptor agonist quinpirole on the in vivo release of dopamine in the caudate nucleus of hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 201, n. 2–3, p. 125–133, 29 Aug. 1991.

LINTHORST, A. C. *et al.* Effect of SCH 23390 and quinpirole on novelty-induced grooming behaviour in spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 219, n. 1, p. 23–28, 14 Aug. 1992.

LIU, A. *et al.* The Prevalence of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder among Chinese Children and Adolescents. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11169, 16 Aug. 2018.

LU, L. *et al.* Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine self-administration in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, n. 6, p. 1604–1613, Jun. 2003.

LU, X. Y.; GHASEMZADEH, M. B.; KALIVAS, P. W. Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. **Neuroscience**, v. 82, n. 3, p. 767–780, Feb. 1998.

LUO, Z. *et al.* Acute cocaine induces fast activation of D1 receptor and progressive deactivation of D2 receptor striatal neurons: in vivo optical microprobe

[Ca²⁺]_i imaging. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 37, p. 13180–13190, 14 Sep. 2011.

MACHIDA, T.; YONEZAWA, Y.; NOUMURA, T. Age-associated changes in plasma testosterone levels in male mice and their relation to social dominance or subordination. **Hormones and Behavior**, v. 15, n. 3, p. 238–245, Sep. 1981.

MACPHAIL, R. C.; GOLLUB, L. R. Independence of the effects of d-amphetamine and food deprivation or body weight on the food consumption of rats. **Psychopharmacologia**, v. 34, n. 2, p. 163–173, 11 Jan. 1974.

MACPHERSON, T.; MORITA, M.; HIKIDA, T. Striatal direct and indirect pathways control decision-making behavior. **Frontiers in Psychology**, v. 5, p. 1301, 12 Nov. 2014.

MADSEN, O. *et al.* Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. **Nature**, v. 409, n. 6820, p. 610–614, 1 Feb. 2001.

MANDELL, A. J.; MORGAN, M. Amphetamine induced increase in tyrosine hydroxylase activity. **Nature**, v. 227, n. 5253, p. 75–76, 4 Jul. 1970.

MARIGGIÒ, M. A. *et al.* DRD1 and DRD2 receptor polymorphisms: genetic neuromodulation of the dopaminergic system as a risk factor for ASD, ADHD and ASD/ADHD overlap. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, p. 705890, 29 Sep. 2021.

MARIOTTI, K. C. *et al.* Amphetamine-type medicines: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicological aspects. **Current clinical pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 350–357, Nov. 2013.

MATTEI, R.; CARLINI, E. A. A comparative study of the anorectic and behavioral effects of fenproporex on male and female rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 8, p. 1025–1030, Aug. 1996.

MCCANN, U. D.; RICAURTE, G. A. Amphetamine neurotoxicity: accomplishments and remaining challenges. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 8, p. 821–826, Jan. 2004.

MCKENDRICK, G.; GRAZIANE, N. M. Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, p. 582147, 29 Sep. 2020.

MCKETIN, R. *et al.* Mental health outcomes associated with of the use of amphetamines: A systematic review and meta-analysis. **EClinicalMedicine**, v. 16, p. 81–97, Nov. 2019.

MCPHERSON, C. S.; LAWRENCE, A. J. Exposure to amphetamine in rats during periadolescence establishes behavioural and extrastriatal neural sensitization in adulthood. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 377–392, Aug. 2006.

MECHANIC, J. A.; MAYNARD, B. T.; HOLLOWAY, F. A. Treatment with the atypical antipsychotic, olanzapine, prevents the expression of amphetamine-induced place conditioning in the rat. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 43–54, Feb. 2003.

MECK, W. H. Neuroanatomical localization of an internal clock: a functional link between mesolimbic, nigrostriatal, and mesocortical dopaminergic systems. **Brain Research**, v. 1109, n. 1, p. 93–107, 13 Sep. 2006.

MEDEIROS, G. F. D. **Caracterização fenotípica e molecular da linhagem congênica de ratos SHR. LEW-Anxrr16 como um novo modelo genético para o estudo da ansiedade.** TESE: UFSC, 2012.

MELO, C. M.; OLIVEIRA, D. R. The use of appetite inhibitors by women: an insight based on the gender perspective. **Ciência & saúde coletiva**, v. 16, n. 5, p. 2523–2532, May 2011

MESSIER, C. *et al.* Bidirectional potentiation between D1 and D2 dopamine agonists: effects of unilateral intra-accumbens injections on locomotor activity in mice. **Life Sciences**, v. 49, n. 9, p. PL43-8, 1991.

METZ, V. G. *et al.* Omega-3 decreases D1 and D2 receptors expression in the prefrontal cortex and prevents amphetamine-induced conditioned place preference in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 67, p. 182–189, May 2019.

MICHEL, M. C. Receptors for neuropeptide Y: multiple subtypes and multiple second messengers. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 10, p. 389–394, Oct. 1991.

MILLER, E. M. *et al.* Chronic Methylphenidate Alters Tonic and Phasic Glutamate Signaling in the Frontal Cortex of a Freely-Moving Rat Model of ADHD. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 1, p. 89–101, Jan. 2019.

MINZENBERG, M. J. Pharmacotherapy for attention-deficit/hyperactivity disorder: from cells to circuits. **Neurotherapeutics**, v. 9, n. 3, p. 610–621, Jul. 2012.

MISERENDINO, M. J.; NESTLER, E. J. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. **Brain Research**, v. 674, n. 2, p. 299–306, 20 Mar. 1995.

MITHANI, S. *et al.* The effects of haloperidol on amphetamine- and methylphenidate-induced conditioned place preferences and locomotor activity. **Psychopharmacology**, v. 90, n. 2, p. 247–252, 1986.

MOREIRA, C. Q. *et al.* Developmental exposure to fenproporex: reproductive and morphological evaluation. **Human & Experimental Toxicology**, v. 24, n. 8, p. 397–402, Aug. 2005.

MOREIRA, V. M. *et al.* Administração de femproporex em ratas exercitadas: efeitos fisiológicos e implicações do uso desta substância na obesidade. **Praxia-Revista on-line de Educação Física da UEG**, v. 1, n. 3, p. 25–35, 2013.

MUKDA, S. *et al.* Amphetamine-induced changes in dopamine receptors in early postnatal rat brain. **Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 193–201, 15 Jan. 2009.

MULLINS, D. E.; ZHANG, X.; HAWES, B. E. Activation of extracellular signal regulated protein kinase by neuropeptide Y and pancreatic polypeptide in CHO cells expressing the NPY Y1, Y2, Y4 and Y5 receptor subtypes. **Regulatory Peptides**, v. 105, n. 1, p. 65–73, Apr. 2002.

MUÑOZ, M.; COVEÑAS, R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. **Amino Acids**, v. 46, n. 7, p. 1727–1750, Jul. 2014.

MURPHY, W. J. *et al.* Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. **Nature**, v. 409, n. 6820, p. 614–618, 1 Feb. 2001.

MYERS, M. M.; MUSTY, R. E.; HENDLEY, E. D. Attenuation of hyperactivity in the spontaneously hypertensive rat by amphetamine. **Behavioral and Neural Biology**, v. 34, n. 1, p. 42–54, Jan. 1982.

MYERS, M. M.; WHITTEMORE, S. R.; HENDLEY, E. D. Forebrain catecholamine mechanisms in the spontaneously hypertensive rat. . **Catecholamines and Stress: Recent Advances**, p. 79–84, 1980.

NIH, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Consideration of Sex as a Biological Variable in NIH-funded Research. p. 4–6, 2014.

NADER, M. A. *et al.* PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 8, p. 1050–1056, Aug. 2006.

NAIR-ROBERTS, R. G. *et al.* Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 1024–1031, 9 Apr. 2008.

NAPPO, S. A. *et al.* Use of anorectic amphetamine-like drugs by Brazilian women. **Eating Behaviors**, v. 3, n. 2, p. 153–165, 2002.

NAZARIAN, A. *et al.* The role of D1 and D2 receptors in the cocaine conditioned place preference of male and female rats. **Brain Research Bulletin**, v. 63, n. 4, p. 295–299, 30 May 2004.

NEIL, A. *et al.* Opiate receptors, neuropeptides in CNS and CSF of two Macaca species with different responsiveness to opiates. **European Journal of Pharmacology**, v. 122, n. 1, p. 143–147, 11 Mar. 1986.

NORDQUIST, R. E. *et al.* Expression of amphetamine sensitization is associated with recruitment of a reactive neuronal population in the nucleus accumbens core. **Psychopharmacology**, v. 198, n. 1, p. 113–126, May 2008.

NUSSBAUM, N. L. ADHD and female specific concerns: a review of the literature and clinical implications. **Journal of attention disorders**, v. 16, n. 2, p. 87–100, Feb. 2012.

O'CONNOR, T. G. *et al.* Maternal antenatal anxiety and children's behavioural/emotional problems at 4 years. Report from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. **The British Journal of Psychiatry**, v. 180, p. 502–508, Jun. 2002.

OHLMEIER, M. D. *et al.* Comorbidity of alcohol and substance dependence with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Alcohol and Alcoholism**, v. 43, n. 3, p. 300–304, Jun. 2008.

OKAMOTO, K. *et al.* Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 30, n. 6, p. 703–716, Jun. 1966.

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

OLIVEIRA, D. B. DE; BARRETO, N. M. P. V.; OLIVEIRA, I. R. DE. Prevalência do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) em uma Escola Pública da cidade de Salvador, BA. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, n. 3, p. 354, 15 Dec. 2016.

OLIVEIRA, J. S. B. DE *et al.* Aspectos relevantes do uso indiscriminado defármacos para perda de peso. **Rev. Funec Científica – Nutrição**, v. 1, n. 2, 1 Jan. 2014.

ORSINI, C. A. *et al.* Food consumption and weight gain after cessation of chronic amphetamine administration. **Appetite**, v. 78, p. 76–80, Jul. 2014.

PAMPLONA, F. A. *et al.* Environmental enrichment improves cognitive deficits in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): relevance for Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 1153–1160, 1 Oct. 2009.

PAN, Y. *et al.* Synthesis, protein levels, activity, and phosphorylation state of tyrosine hydroxylase in mesoaccumbens and nigrostriatal dopamine pathways of chronically food-restricted rats. **Brain Research**, v. 1122, n. 1, p. 135–142, 29 Nov. 2006.

PANDOLFO, P. *et al.* Cannabinoid-induced conditioned place preference in the spontaneously hypertensive rat-an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **Psychopharmacology**, v. 205, n. 2, p. 319–326, Aug. 2009.

PANDOLFO, P. *et al.* Caffeine regulates frontocorticostriatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 4, p. 317–328, Apr. 2013.

PANG, X. *et al.* Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) among elementary students in rural China: Prevalence, correlates, and consequences. **Journal of Affective Disorders**, v. 293, p. 484–491, 1 Oct. 2021.

PANLILIO, L. V. Stimulant Self-Administration. In: OLMSTEAD, M. C. (Ed.). **Animal models of drug addiction**. Neuromethods. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. v. 53p. 57–81.

PAPA, M. *et al.* A rostro-caudal dissociation in the dorsal and ventral striatum of the juvenile SHR suggests an anterior hypo- and a posterior hyperfunctioning mesocorticolimbic system. **Behavioural Brain Research**, v. 130, n. 1–2, p. 171–179, 10 Mar. 2002.

PARKER, C. C. *et al.* Rats are the smart choice: Rationale for a renewed focus on rats in behavioral genetics. **Neuropharmacology**, v. 76 Pt B, n. 0 0, p. 250–258, Jan. 2014.

PARO, A. H. *et al.* Exposição repetida à cafeína aumenta a atividade locomotora induzida pelo femproporex em ratos adolescentes e adultos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, Sep. 2008.

PAULSON, P. E.; ROBINSON, T. E. Amphetamine-induced time-dependent sensitization of dopamine neurotransmission in the dorsal and ventral striatum: a microdialysis study in behaving rats. **Synapse**, v. 19, n. 1, p. 56–65, Jan. 1995.

PAUMGARTTEN, F. J. R. The ethical limits of physicians' autonomy and the Brazilian Federal Council of Medicine. **Cadernos de Saude Publica**, v. 38, n. 5, p. e00259021, 8 Jun. 2022.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; PEREIRA, S. S. T. C.; DE OLIVEIRA, A. C. A. X. Safety and efficacy of fenproporex for obesity treatment: a systematic review. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 25, 24 May 2016.

PAYER, D. *et al.* Corticotropin-releasing hormone and dopamine release in healthy individuals. **Psychoneuroendocrinology**, v. 76, p. 192–196, Feb. 2017.

PÉLISSIER-ALICOT, A. L. *et al.* Abusive prescription of psychostimulants: a study of two cases. **Journal of Forensic Sciences**, v. 51, n. 2, p. 407–410, Mar. 2006.

PELLOUX, Y.; COSTENTIN, J.; DUTERTE-BOUCHER, D. Anxiety increases the place conditioning induced by cocaine in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 197, n. 2, p. 311–316, 11 Feb. 2009.

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**, v. 47, n. 5, p. 552–563, Sep. 2017.

PHILLIPS, A. G.; LEPIANE, F. G. Reinforcing effects of morphine microinjection into the ventral tegmental area. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 12, n. 6, p. 965–968, Jun. 1980.

PHILLIPS, A. G.; LEPIANE, F. G.; FIBIGER, H. C. Dopaminergic mediation of reward produced by direct injection of enkephalin into the ventral tegmental area of the rat. **Life Sciences**, v. 33, n. 25, p. 2505–2511, 19 Dec. 1983.

PIAZZA, P. V. *et al.* Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. **Science**, v. 245, n. 4925, p. 1511–1513, 29 Sep. 1989.

PIERCE, R. C. *et al.* Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 1550–1560, 15 Feb. 1996.

PIERCE, R. C.; KALIVAS, P. W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 25, n. 2, p. 192–216, Oct. 1997.

PIJNENBURG, A. J.; VAN ROSSUM, J. M. Letter: Stimulation of locomotor activity following injection of dopamine into the nucleus accumbens. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 25, n. 12, p. 1003–1005, Dec. 1973.

PIÑEIRO-DIEGUEZ, B. *et al.* Psychiatric comorbidity at the time of diagnosis in adults with ADHD: the CAT study. **Journal of attention disorders**, v. 20, n. 12, p. 1066–1075, Dec. 2016.

PIRES, F. S. *et al.* Uma simples exposição ao femproporex induz a sensibilização comportamental, um modelo animal de farmacodependência. **Anais do VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação**, 2008.

PISANU, A. *et al.* Impairment of acquisition of intravenous cocaine self-administration by RNA-interference of dopamine D1-receptors in the nucleus accumbens shell. **Neuropharmacology**, v. 89, p. 398–411, Feb. 2015.

POLANCZYK, G. *et al.* The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. **The American Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 6, p. 942–948, Jun. 2007.

PREDIGER, R. D. *et al.* The Use of Object Recognition Task in Animal Models of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. In: ENNACEUR, A.; SILVA, M. A. DE S. (Eds.). **Handbook of object novelty recognition**. Handbook of behavioral neuroscience. Elsevier, 2018. v. 27p. 341–357.

PRUS, A. J.; JAMES, J. R.; ROSECRANS, J. A. Conditioned Place Preference. In: BUCCAFUSCO, J. J. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. Frontiers in Neuroscience. 2nd. ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2009.

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, 28 Feb. 2003.

PULVIRENTI, L. *et al.* The role of limbic-accumbens-pallidal circuitry in the activating and reinforcing properties of psychostimulant drugs. **The mesolimbic dopamine system: From motivation to action**, p. 131–140, 1991.

QUINN, P. O.; MADHOO, M. A review of attention-deficit/hyperactivity disorder in women and girls: uncovering this hidden diagnosis. **The primary care companion for CNS disorders**, v. 16, n. 3, 13 Oct. 2014.

RABINER, D.; COIE, J. D. Early attention problems and children's reading achievement: a longitudinal investigation. The Conduct Problems Prevention Research Group. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 39, n. 7, p. 859–867, Jul. 2000.

RABINER, D. L. Stimulant prescription cautions: addressing misuse, diversion and malingering. **Current Psychiatry Reports**, v. 15, n. 7, p. 375, Jul. 2013.

RADEMACHER, D. J. *et al.* The neural substrates of amphetamine conditioned place preference: implications for the formation of conditioned stimulus-reward associations. **The European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 7, p. 2089–2097, Oct. 2006.

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, Apr. 1997.

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

RAMOS, A. *et al.* Hunting for genes underlying emotionality in the laboratory rat: maps, tools and traps. **Current neuropharmacology**, v. 21, n. 9, p. 1840–1863, 2023.

RASMUSSEN, K.; LEVANDER, S. Untreated ADHD in adults: are there sex differences in symptoms, comorbidity, and impairment? **Journal of attention disorders**, v. 12, n. 4, p. 353–360, Jan. 2009.

REGAN, S. L.; WILLIAMS, M. T.; VORHEES, C. V. Review of rodent models of attention deficit hyperactivity disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 132, p. 621–637, Jan. 2022.

RETZ, W.; RETZ-JUNGINGER, P. Prediction of methylphenidate treatment outcome in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 264 Suppl 1, p. S35-43, Nov. 2014.

REZIN, G. T. *et al.* Brain energy metabolism is activated after acute and chronic administration of fenproporex in young rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 8, p. 937–942, Dec. 2011.

REZIN, G. T. *et al.* Inhibition of acetylcholinesterase activity in brain and behavioral analysis in adult rats after chronic administration of fenproporex. **Metabolic brain disease**, v. 27, n. 4, p. 453–458, Dec. 2012.

REZIN, G. T. *et al.* Fenproporex increases locomotor activity and alters energy metabolism, and mood stabilizers reverse these changes: a proposal for a new animal model of mania. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 2, p. 877–892, Apr. 2014a.

REZIN, G. T. *et al.* Evaluation of Na⁺, K⁺-ATPase activity in the brain of young rats after acute administration of fenproporex. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 36, n. 2, p. 138–142, Jun. 2014b.

RICHTER, C. P. The effects of domestication and selection on the behavior of the Norway rat. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 15, n. 3, p. 727–738, Dec. 1954.

ROBBINS, S. J.; EHRMAN, R. N. Designing studies of drug conditioning in humans. **Psychopharmacology**, v. 106, n. 2, p. 143–153, 1992.

ROBBINS, T. W. *et al.* Effects of dopamine depletion from the caudate-putamen and nucleus accumbens septi on the acquisition and performance of a conditional discrimination task. **Behavioural Brain Research**, v. 38, n. 3, p. 243–261, 28 May 1990.

ROBERTS, M. D. *et al.* Dopamine D1 receptor modulation in nucleus accumbens lowers voluntary wheel running in rats bred to run high distances. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 3, p. 661–668, 1 Feb. 2012.

ROBINSON, T. E. *et al.* Persistent sensitization of dopamine neurotransmission in ventral striatum (nucleus accumbens) produced by prior experience with (+)-amphetamine: a microdialysis study in freely moving rats. **Brain Research**, v. 462, n. 2, p. 211–222, 18 Oct. 1988.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Incentive-sensitization and addiction. **Addiction**, v. 96, n. 1, p. 103–114, Jan. 2001.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801–810, Nov. 1997.

RODRIGUES, A. M. *et al.* The cerebrospinal fluid/serum leptin ratio during pharmacological therapy for obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 4, p. 1621–1626, Apr. 2002.

ROJAS-CARVAJAL, M.; SEQUEIRA-CORDERO, A.; BRENES, J. C. Neurobehavioral effects of restricted and unpredictable environmental enrichment in rats. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 674, 12 May 2020.

RONALD, A.; DE BODE, N.; POLDERMAN, T. J. C. Systematic Review: How the Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Polygenic Risk Score Adds to Our Understanding of ADHD and Associated Traits. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 60, n. 10, p. 1234–1277, Oct. 2021.

RUCKLIDGE, J. J. Gender differences in attention-deficit/hyperactivity disorder. **The Psychiatric Clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 357–373, Jun. 2010.

RUSSELL, V. *et al.* Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. **Brain Research**, v. 676, n. 2, p. 343–351, 10 Apr. 1995.

RUSSELL, V. A. Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder--

the spontaneously hypertensive rat. **Behavioural Brain Research**, v. 130, n. 1–2, p. 191–196, 10 Mar. 2002.

RUSSELL, V. A. In vitro glutamate-stimulated release of dopamine from nucleus accumbens core and shell of spontaneously hypertensive rats. **Metabolic brain disease**, v. 18, n. 2, p. 161–168, Jun. 2003a.

RUSSELL, V. A. Dopamine hypofunction possibly results from a defect in glutamate-stimulated release of dopamine in the nucleus accumbens shell of a rat model for attention deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 7, p. 671–682, Nov. 2003b.

RUSSELL, V. A.; SAGVOLDEN, T.; JOHANSEN, E. B. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioral and Brain Functions**, v. 1, p. 9, 15 Jul. 2005.

RUSSO, S. J. *et al.* The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 6, p. 267–276, 1 Jun. 2010.

RYAN, D. *et al.* The Global Pandemic of Overweight and Obesity: Addressing a Twenty-First Century Multifactorial Disease. In: KICKBUSCH, I.; GANTEN, D.; MOETI, M. (Eds.). **Handbook of global health**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 739–773.

SACHDEV, P. S.; SAHAROV, T. Effects of specific dopamine D1 and D2 receptor antagonists and agonists and neuroleptic drugs on emotional defecation in a rat model of akathisia. **Psychiatry Research**, v. 81, n. 3, p. 323–332, 14 Dec. 1998.

SADDORIS, M. P. *et al.* Rapid dopamine dynamics in the accumbens core and shell: learning and action. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 5, p. 273–288, 1 Jan. 2013.

SADILE, A. G. Multiple evidence of a segmental defect in the anterior forebrain of an animal model of hyperactivity and attention deficit. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 1, p. 161–169, Jan. 2000.

SAGVOLDEN, T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 1, p. 31–39, Jan. 2000.

SAGVOLDEN, T. *et al.* Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1239–1247, 1 Jun. 2005.

SAGVOLDEN, T. *et al.* The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 7–8, p. 619–626, Dec. 2009.

SAGVOLDEN, T.; XU, T. L-Amphetamine improves poor sustained attention while d-amphetamine reduces overactivity and impulsiveness as well as improves

sustained attention in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). **Behavioral and Brain Functions**, v. 4, p. 3, 23 Jan. 2008.

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addiction Biology**, v. 11, n. 1, p. 2–38, Mar. 2006.

SANTARELLI, L. *et al.* Behavioral and physiologic effects of genetic or pharmacologic inactivation of the substance P receptor (NK1). **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 63 Suppl 11, p. 11–17, 2002.

SANTOS, L. DE F.; VASCONCELOS, L. A. Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade em crianças: uma revisão interdisciplinar. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 26, n. 4, p. 717–724, Dec. 2010.

SARA, G. E. *et al.* Stimulant use disorders in people with psychosis: a meta-analysis of rate and factors affecting variation. **The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 49, n. 2, p. 106–117, Feb. 2015.

SARA, S. J.; DEWEER, B. Memory retrieval enhanced by amphetamine after a long retention interval. **Behavioral and Neural Biology**, v. 36, n. 2, p. 146–160, Oct. 1982.

SAX, K. W.; STRAKOWSKI, S. M. Behavioral sensitization in humans. **Journal of addictive diseases**, v. 20, n. 3, p. 55–65, 2001.

SCHANK, J. R.; HEILIG, M. Substance P and the Neurokinin-1 Receptor: The new CRF. **International Review of Neurobiology**, v. 136, p. 151–175, 18 Aug. 2017.

SCHATZ, D. B.; ROSTAIN, A. L. ADHD with comorbid anxiety: a review of the current literature. **Journal of attention disorders**, v. 10, n. 2, p. 141–149, Nov. 2006.

SCHERES, A. *et al.* Ventral striatal hyporesponsiveness during reward anticipation in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 5, p. 720–724, 1 Mar. 2007.

SCHETZ, M. *et al.* Obesity in the critically ill: a narrative review. **Intensive Care Medicine**, v. 45, n. 6, p. 757–769, Jun. 2019.

SCHILDEIN, S. *et al.* Intraaccumbens injections of substance P, morphine and amphetamine: effects on conditioned place preference and behavioral activity. **Brain Research**, v. 790, n. 1–2, p. 185–194, 20 Apr. 1998.

SCHOLL, J. L. *et al.* Individual differences in amphetamine sensitization, behavior and central monoamines. **Physiology & Behavior**, v. 96, n. 3, p. 493–504, 2 Mar. 2009.

SCHULTZ, W. Updating dopamine reward signals. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, n. 2, p. 229–238, Apr. 2013.

SHAHAM, Y.; STEWART, J. Effects of opioid and dopamine receptor antagonists on relapse induced by stress and re-exposure to heroin in rats. **Psychopharmacology**, v. 125, n. 4, p. 385–391, Jun. 1996.

SHANSKY, R. M. Are hormones a “female problem” for animal research? **Science**, v. 364, n. 6443, p. 825–826, 31 May 2019.

SHAO, C. *et al.* Dopamine D4 receptor polymorphism modulates cue-elicited heroin craving in Chinese. **Psychopharmacology**, v. 186, n. 2, p. 185–190, Jun. 2006.

SHARMA, A.; COUTURE, J. A review of the pathophysiology, etiology, and treatment of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 48, n. 2, p. 209–225, Feb. 2014.

SHERIFF, S. *et al.* Predominant role by CaM kinase in NPY Y1 receptor signaling: Involvement of CREB and Ambikaipakan. **Peptides**, v. 23, n. 1, p. 87–96, Jan. 2002.

SIMON, V. *et al.* Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. **The British Journal of Psychiatry**, v. 194, n. 3, p. 204–211, Mar. 2009.

SINGH, I. Beyond polemics: science and ethics of ADHD. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 12, p. 957–964, Dec. 2008.

SINGH, I. *et al.* Globalization and cognitive enhancement: emerging social and ethical challenges for ADHD clinicians. **Current Psychiatry Reports**, v. 15, n. 9, p. 385, Sep. 2013.

SKINNER, B. F. Two types of conditioned reflex: A reply to konorski and miller. **The Journal of general psychology**, v. 16, n. 1, p. 272–279, Jan. 1937.

SKOUNTI, M.; PHILALITHIS, A.; GALANAKIS, E. Variations in prevalence of attention deficit hyperactivity disorder worldwide. **European Journal of Pediatrics**, v. 166, n. 2, p. 117–123, Feb. 2007.

SMITH, B. R.; COHEN, P. A. Dependence on the Brazilian diet pill: a case report. **The American Journal on Addictions**, v. 19, n. 3, p. 291–292, Jun. 2010.

SMITH, J. R. *et al.* The Year of the Rat: The Rat Genome Database at 20: a multi-species knowledgebase and analysis platform. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D731–D742, 8 Jan. 2020.

SOARES-CUNHA, C. *et al.* Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion. **Molecular Psychiatry**, v. 25, n. 12, p. 3241–3255, Dec. 2020.

SONUGA-BARKE, E. J. S. Causal models of attention-deficit/hyperactivity disorder: from common simple deficits to multiple developmental pathways. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1231–1238, 1 Jun. 2005.

SOUSA, D. V. **Anfetaminas: efeitos, mecanismo de ação, usos clínicos e de abuso**. TESE: Cuité: CES, 2015.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 4, p. 417–463, Jun. 2000.

SPEAR, L. P.; BRAKE, S. C. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 16, n. 2, p. 83–109, Mar. 1983.

SPENCE, J. P. *et al.* Estrogen-Dependent Upregulation of Adcyap1r1 Expression in Nucleus Accumbens Is Associated With Genetic Predisposition of Sex-Specific QTL for Alcohol Consumption on Rat Chromosome 4. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 513, 4 Dec. 2018.

SPERANZA, L. *et al.* Dopamine: The Neuromodulator of Long-Term Synaptic Plasticity, Reward and Movement Control. **Cells**, v. 10, n. 4, 26 Mar. 2021.

SPYRAKI, C.; FIBIGER, H. C.; PHILLIPS, A. G. Dopaminergic substrates of amphetamine-induced place preference conditioning. **Brain Research**, v. 253, n. 1–2, p. 185–193, 16 Dec. 1982.

SPYRAKI, C.; NOMIKOS, G. G.; VARONOS, D. D. Intravenous cocaine-induced place preference: attenuation by haloperidol. **Behavioural Brain Research**, v. 26, n. 1, p. 57–62, Oct. 1987.

STĂCESCU, ȘTEFANA *et al.* A historical overview upon the use of amphetamine derivatives in the treatment of obesity. **Journal of Plantation Crops**, 4 Feb. 2020.

STEINHOFF, M. S. *et al.* Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 265–301, Jan. 2014.

SUGAYA, L. S. *et al.* Efficacy and safety of methylphenidate and behavioural parent training for children aged 3-5 years with attention-deficit hyperactivity disorder: a randomised, double-blind, placebo-controlled, and sham behavioural parent training-controlled trial. **Lancet Child and Adolescent Health**, v. 6, n. 12, p. 845–856, Dec. 2022.

SUPLICY, H. *et al.* A comparative study of five centrally acting drugs on the pharmacological treatment of obesity. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 8, p. 1097–1103, Aug. 2014.

SWANSON, C. J. *et al.* Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 58, n. 4, p. 933–945, Dec. 1997.

SZOBOT, C. M. *et al.* Is attention-deficit/hyperactivity disorder associated with illicit substance use disorders in male adolescents? A community-based case-control study. **Addiction**, v. 102, n. 7, p. 1122–1130, Jul. 2007.

TAKITANE, J. *et al.* Amphetamine use by truck drivers on highways of Sao Paulo State: a risk for the occurrence of traffic accidents?. **Ciencia & saude coletiva**, v. 18, n. 5, p. 1247–1254, May 2013.

TANAKA, M.; YAMADA, S.; WATANABE, Y. The role of neuropeptide Y in the nucleus accumbens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, 7 Jul. 2021.

TANIGUCHI, J. G. **A influência do ciclo estral no comportamento das linhagens de ratos congênica SLA16 e isogênica SHR**. TESE: UNESP, 2013.

TAVELLA, R. A. *et al.* Prevalence of illicit drug use during pregnancy: A global perspective. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 4, p. e20200302, 7 Dec. 2020.

TECOTT, L. H. The genes and brains of mice and men. **The American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 4, p. 646–656, Apr. 2003.

TEODORAK, B. P. *et al.* Acute administration of fenproporex increased acetylcholinesterase activity in brain of young rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2 Suppl, p. 1389–1395, 4 Aug. 2015.

THÉBERGE, F. R. M. *et al.* The basolateral amygdala and nucleus accumbens core mediate dissociable aspects of drug memory reconsolidation. **Learning & Memory**, v. 17, n. 9, p. 444–453, Sep. 2010.

THOMAS, R. *et al.* Prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. **Pediatrics**, v. 135, n. 4, p. e994-1001, Apr. 2015.

TODD, R. D. *et al.* Collaborative analysis of DRD4 and DAT genotypes in population-defined ADHD subtypes. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, v. 46, n. 10, p. 1067–1073, Oct. 2005.

TOGNONI, G.; MORSELLI, P. L.; GARATTINI, S. Amphetamine concentrations in rat brain and human urine after fenproporex administration. **European Journal of Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 125–126, Oct. 1972.

TRAN, M. N. *et al.* Single-nucleus transcriptome analysis reveals cell-type-specific molecular signatures across reward circuitry in the human brain. **Neuron**, v. 109, n. 19, p. 3088- 3103.e5, 6 Oct. 2021.

TSAI, C. F.; LIN, M. T. Locomotor hyperactivity in hypertensive rats. **Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 27–34, 1988.

TSUANG, M. T. *et al.* Genetic influences on DSM-III-R drug abuse and dependence: a study of 3,372 twin pairs. **American Journal of Medical Genetics**, v. 67, n. 5, p. 473–477, 20 Sep. 1996.

TU, G. *et al.* Dopamine D1 and D2 receptors differentially regulate rac1 and cdc42 signaling in the nucleus accumbens to modulate behavioral and structural

plasticity after repeated methamphetamine treatment. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 11, p. 820–835, 1 Dec. 2019.

TUCHMAN, Ellen. **Women and addiction: the importance of gender issues in substance abuse research**. Women, Children, and Addiction. Routledge, 2014.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. **Progress in Neurobiology**, v. 56, n. 6, p. 613–672, Dec. 1998.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. **Addiction Biology**, v. 12, n. 3–4, p. 227–462, Sep. 2007.

UNODC, UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report 2022**. United Nations, 2022. Disponível em: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html>

VAN DEN BUUSE, M. *et al.* Role of brain dopamine systems in the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. **Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice**, v. 13, n. 5, p. 653–659, 1991.

VAN DER KOOY, D. *et al.* Reinforcing effects of brain microinjections of morphine revealed by conditioned place preference. **Brain Research**, v. 243, n. 1, p. 107–117, 8 Jul. 1982.

VAN EMMERIK-VAN OORTMERSSEN, K. *et al.* Prevalence of attention-deficit hyperactivity disorder in substance use disorder patients: a meta-analysis and meta-regression analysis. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 122, n. 1–2, p. 11–19, 1 Apr. 2012.

VAN ETTEN, M. L.; ANTHONY, J. C. Comparative epidemiology of initial drug opportunities and transitions to first use: marijuana, cocaine, hallucinogens and heroin. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 54, n. 2, p. 117–125, 1 Apr. 1999.

VASCONCELOS, M. M. *et al.* Attention deficit/hyperactivity disorder prevalence in an inner city elementary school. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 1, p. 67–73, Mar. 2003.

VELÁZQUEZ, A. M. *et al.* The influence of chromosome 4 on metabolism and spatial memory in SHR and SLA16 rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 370, p. 111966, 16 Sep. 2019.

VENDRUSCOLO, L. F. *et al.* Chronic methylphenidate treatment during adolescence increases anxiety-related behaviors and ethanol drinking in adult spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 21–27, Feb. 2008.

VENDRUSCOLO, L. F.; IZÍDIO, G. S.; TAKAHASHI, R. N. Drug reinforcement in a rat model of attention deficit/hyperactivity disorder--the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). **Current drug abuse reviews**, v. 2, n. 2, p. 177–183, May 2009.

VEZINA, P. *et al.* Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity promotes the pursuit of amphetamine. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 4654–4662, 1 Jun. 2002.

VIGGIANO, D.; VALLONE, D.; SADILE, A. Dysfunctions in dopamine systems and ADHD: evidence from animals and modeling. **Neural plasticity**, v. 11, n. 1–2, p. 97–114, 2004.

VOLKOW, N. D. *et al.* Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. **The American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 12, p. 2015–2021, Dec. 2001.

VOLKOW, N. D. *et al.* Low level of brain dopamine d₂ receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. **Focus**, v. 1, n. 2, p. 150–157, Apr. 2003.

VOLKOW, N. D. *et al.* High levels of dopamine D2 receptors in unaffected members of alcoholic families: possible protective factors. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 9, p. 999–1008, Sep. 2006.

VOLKOW, N. D. *et al.* Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. **Neuropharmacology**, v. 56 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 3–8, 2009.

VOLKOW, N. D. *et al.* Motivation deficit in ADHD is associated with dysfunction of the dopamine reward pathway. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 11, p. 1147–1154, Nov. 2011.

VOLKOW, N. D.; MORALES, M. The brain on drugs: from reward to addiction. **Cell**, v. 162, n. 4, p. 712–725, 13 Aug. 2015.

VÖRÖS, Z.; LUKOVSKY, L. The effects of subclinical ADHD symptomatology on the subjective financial, physical, and mental well-being of entrepreneurs and employees. **Journal of Business Venturing Insights**, v. 15, p. e00240, Jun. 2021.

VSEVOLOZHSKAYA, O. A.; ANTHONY, J. C. Transitioning from First Drug Use to Dependence Onset: Illustration of a Multiparametric Approach for Comparative Epidemiology. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 3, p. 869–876, Feb. 2016.

VUONG, S. M. *et al.* Increased anxiety-like behavior of rats during amphetamine withdrawal is reversed by CRF2 receptor antagonism. **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 278–281, 17 Mar. 2010.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007.

WANG, Y. L. *et al.* Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 21, 17 Jan. 2018.

WASCHBUSCH, D. A.; KING, S. Should sex-specific norms be used to assess attention-deficit/hyperactivity disorder or oppositional defiant disorder? **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 74, n. 1, p. 179–185, Feb. 2006.

WELLS, A. M. *et al.* Medial temporal lobe functioning and structure in the spontaneously hypertensive rat: comparison with Wistar-Kyoto normotensive and Wistar-Kyoto hypertensive strains. **Hippocampus**, v. 20, n. 6, p. 787–797, Jun. 2010.

WHITE, N. M.; PACKARD, M. G.; HIROI, N. Place conditioning with dopamine D1 and D2 agonists injected peripherally or into nucleus accumbens. **Psychopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 271–276, 1991.

WISE, R. A. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. **Neuron**, v. 36, n. 2, p. 229–240, 10 Oct. 2002.

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychological Review**, v. 94, n. 4, p. 469–492, Oct. 1987.

WOLF, M. E. *et al.* Differential development of autoreceptor subsensitivity and enhanced dopamine release during amphetamine sensitization. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 264, n. 1, p. 249–255, Jan. 1993.

WULTZ, B. *et al.* The spontaneously hypertensive rat as an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate on exploratory behavior. **Behavioral and Neural Biology**, v. 53, n. 1, p. 88–102, Jan. 1990.

YAN, T. C. *et al.* Performance deficits of NK1 receptor knockout mice in the 5-choice serial reaction-time task: effects of d-amphetamine, stress and time of day. **Plos One**, v. 6, n. 3, p. e17586, 7 Mar. 2011.

YANG, H. *et al.* Nucleus accumbens subnuclei regulate motivated behavior via direct inhibition and disinhibition of VTA dopamine subpopulations. **Neuron**, v. 97, n. 2, p. 434–449.e4, 17 Jan. 2018.

YATES, J. R. *et al.* High impulsivity in rats predicts amphetamine conditioned place preference. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 100, n. 3, p. 370–376, Jan. 2012.

ZANELATTO, N.; LARANJEIRA, R. **O Tratamento da Dependência Química e as Terapias Cognitivo-Comportamentais: Um Guia para Terapeutas**. 2nd. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018. v. 1p. 704

ZHANG, G. *et al.* Intranasal administration of testosterone increased immobile-sniffing, exploratory behavior, motor behavior and grooming behavior in rats. **Hormones and Behavior**, v. 59, n. 4, p. 477–483, Apr. 2011.

ZHANG, Y.; ANGULO, J. A. Contrasting effects of repeated treatment vs. withdrawal of methamphetamine on tyrosine hydroxylase messenger RNA levels in the ventral tegmental area and substantia nigra zona compacta of the rat brain. **Synapse**, v. 24, n. 3, p. 218–223, Nov. 1996a.

ZHANG, Y.; ANGULO, J. A. Contrasting effects of repeated treatment vs. withdrawal of methamphetamine on tyrosine hydroxylase messenger RNA levels in the ventral tegmental area and substantia nigra zona compacta of the rat brain. **Synapse**, v. 24, n. 3, p. 218–223, Nov. 1996b.

ZHU, X. *et al.* Maternal deprivation-caused behavioral abnormalities in adult rats relate to a non-methylation-regulated D2 receptor levels in the nucleus accumbens. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 281–288, 19 Jun. 2010.

ZWEIFEL, L. S. *et al.* Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 18, p. 7281–7288, 5 May 2009.

APÊNDICE 1

- Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com repetidas doses de FEN testadas no CA e LCE

Tabela 1 Efeito do tratamento de doses repetidas de fenproporex em ratos fêmeas no teste de campo aberto

	SHR			SLA16			Two-way ANOVA			Results
	Vehicle	Fenproporex	Vehicle	Fenproporex	Strain	Treatment	Interaction			
Distância total (m)	39,32±2,26	40,23±1,67	47,20±1,30	44,19±1,98	F(1,28)=10,31*	F(1,28)=0,32	F(1,28)=1,12	SHR < SLA16		
Velocidade máxima (cm/seg)	0,64±0,03	0,67±0,01	0,66±0,02	0,69±0,02	F(1,28)=1,40	F(1,28)=2,25	F(1,28)=0,01	---		
Entradas no centro (n)	22,38±1,87	19,88±1,19	24,38±1,77	19,25±0,82	F(1,28)=0,21	F(1,28)=6,67*	F(1,28)=0,79	VEH > FEN		
Distância central (m)	9,37±0,87	8,49±0,55	11,35±0,89	8,67±0,66	F(1,28)=2,01	F(1,28)=5,45*	F(1,28)=1,41	VEH > FEN		
Distância periférica (m)	29,95±1,92	31,73±1,42	35,84±1,99	35,52±1,67	F(1,28)=7,49*	F(1,28)=0,17	F(1,28)=0,35	SHR < SLA16		
Tempo no centro (seg)	46,61±7,73	34,30±2,99	49,21±5,46	32,25±2,38	F(1,28)=0,01	F(1,28)=8,23*	F(1,28)=0,20	VEH > FEN		
Tempo na periferia (seg)	253,39±7,73	265,70±2,99	250,49±5,46	267,75±2,38	F(1,28)=0,01	F(1,28)=8,23*	F(1,28)=0,21	VEH < FEN		
Movimentos verticais (n)	47,75±2,48	44,63±3,08	52,63±3,37	37,75±2,02	F(1,28)=0,12	F(1,28)=10,44*	F(1,28)=4,45*	VEH > FEN; SLA16, VEH > SLA16, FEN		
Tempo médio por visita ao centro (seg)	2,02±0,21	1,72±0,09	2,00±0,14	1,69±0,13	F(1,28)=0,03	F(1,28)=4,08*	F(1,28)=0,01	VEH > FEN		
Tempo médio por visita à periferia (seg)	11,84±1,20	13,23±0,88	9,52±0,69	13,46±0,57	F(1,27)=1,39	F(1,27)=9,06*	F(1,27)=2,07	VEH < FEN		
<i>Climbing</i> (n)	39,00±1,83	37,50±1,69	40,75±1,42	33,88±1,85	F(1,28)=0,30	F(1,28)=6,02*	F(1,28)=2,48	VEH > FEN		
<i>Rearing</i> (n)	8,75±1,56	7,13±2,47	11,88±3,17	3,88±0,95	F(1,28)=0,01	F(1,28)=4,75*	F(1,28)=2,08	VEH > FEN		
<i>Grooming</i> (n)	5,25±0,82	6,71±0,47	2,57±0,20	5,63±0,71	F(1,26)=9,00*	F(1,26)=12,94*	F(1,26)=1,60	VEH < FEN; SHR > SLA16		
Tempo de <i>grooming</i> (seg)	14,63±2,35	31,13±5,30	3,63±1,29	14,88±2,53	F(1,28)=17,80*	F(1,28)=18,46*	F(1,28)=0,66	VEH < FEN; SHR > SLA16		
Latência: <i>grooming</i> (seg)	140,4±17,9	88,9±12,4	210,3±23,1	125,13±8,95	F(1,28)=10,36*	F(1,28)=17,18*	F(1,28)=1,04	VEH > FEN; SHR < SLA16		
Tempo de <i>sniffing</i> (seg)	87,88±5,22	86,31±5,27	104,88±5,24	103,81±5,44	F(1,28)=10,61*	F(1,28)=0,06	F(1,28)=0,01	SHR < SLA16		
Defecação (n)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	F(1,28)=0,00	F(1,28)=0,00	F(1,28)=0,00	---		

Ratos fêmeas SHR e SLA16 tratados com veículo (VEH) ou fenproporex (FEN, 4mg/kg, i.p.) avaliados no teste de campo aberto por 5min. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (*p<0,05) com 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de duas vias seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Tabela 2 Efeito do tratamento de doses repetidas de fenproporex em ratos fêmeas no teste de labirinto em cruz elevado

	SHR			SLA16			Two-way ANOVA			Results
	Vehicle	Fenproporex	Vehicle	Fenproporex	Strain	Treatment	Interaction			
Distância total (m)	18,02±0,86	15,60±0,54	19,09±0,85	16,92±0,95	F(1,28)=2,09	F(1,28)=7,81*	F(1,28)=0,02	VEH > FEN		
Entradas no braço aberto (n)	18,1±1,4	15,1±2,0	18,6±0,5	12,6±0,8	F(1,26)=0,56	F(1,26)=10,31*	F(1,26)=1,14	VEH > FEN		
Entradas no braço fechado (n)	21,5±1,3	17,0±1,1	19,6±1,9	17,5±1,8	F(1,28)=0,19	F(1,28)=4,62*	F(1,28)=0,59	VEH > FEN		
Tempo no braço aberto (sec)	82,8±10,6	72,7±8,4	90,5±4,4	90,0±11,4	F(1,28)=1,86	F(1,28)=0,33	F(1,28)=0,27	---		
Tempo no braço fechado (sec)	124,2±10,9	136,9±8,2	116,2±3,6	121,5±8,0	F(1,28)=2,08	F(1,28)=1,23	F(1,28)=0,20	---		
% entradas no braço aberto	45,7±2,7	46,0±4,2	44,6±6,6	37,9±6,3	F(1,28)=0,31	F(1,28)=0,79	F(1,28)=1,00	---		
% entradas no braço fechado	54,3±2,7	54,0±4,2	55,4±6,6	62,1±6,3	F(1,28)=0,31	F(1,28)=0,79	F(1,28)=1,00	---		
% tempo no braço aberto	40,1±5,3	34,6±3,9	43,7±1,9	41,9±4,4	F(1,28)=1,84	F(1,28)=0,78	F(1,28)=0,20	---		
% tempo no braço fechado	59,9±5,3	65,4±3,9	56,3±1,9	58,1±4,4	F(1,28)=1,84	F(1,28)=0,78	F(1,28)=0,20	---		

Ratos fêmeas SHR e SLA16 tratados com veículo (VEH) ou fenproporex (FEN, 4mg/kg, i.p.) avaliados no teste de labirinto em cruz elevado por 5min. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (*p<0,05) com 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de duas vias seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

APÊNDICE 2

- Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN e testadas 22±1h após no CA e LCE

Tabela 1 Efeito do tratamento de dose única de fenproporex (22±1h após a administração) em ratos fêmeas no teste de campo aberto

	SHR		SLA16		Two-way ANOVA			Resultados
	Veículo	Fenproporex	Veículo	Fenproporex	Linhagem	Tratamento	Interação	
Distância total (m)	29,90±1,44	33,85±2,43	40,68±1,31	39,66±1,52	F(1,28)= 22,81*	F(1,28)= 0,70	F(1,28)= 2,05	SHR < SLA16
Velocidade máxima (cm/seg)	0,46±0,03	0,49±0,04	0,58±0,03	0,60±0,03	F(1,28)= 12,94*	F(1,28)= 0,88	F(1,28)= 0,03	SHR < SLA16
Entradas no centro (n)	16,88±0,90	17,13±1,99	22,88±1,54	18,50±1,16	F(1,28)= 6,41*	F(1,28)= 2,00	F(1,28)= 2,52	SHR < SLA16
Distância central (m)	8,15±0,75	7,08±0,89	10,48±0,78	8,48±0,76	F(1,28)= 5,35*	F(1,28)= 3,66	F(1,28)= 0,33	SHR < SLA16
Distância periférica (m)	21,74±1,35	26,76±1,74	30,20±1,01	31,18±1,42	F(1,28)= 20,95*	F(1,28)= 4,53*	F(1,28)= 2,07	SHR < SLA16; Veh < Fen
Tempo no centro (seg)	59,91±8,90	44,14±5,86	55,11±5,22	42,38±6,35	F(1,28)= 0,23	F(1,28)= 4,49*	F(1,28)= 0,05	Veh > Fen
Tempo na periferia (seg)	240,09±8,90	255,86±5,86	244,89±5,22	257,6±6,35	F(1,28)= 0,23	F(1,28)= 4,49*	F(1,28)= 0,05	Veh < Fen
Movimentos verticais (n)	51,75±2,76	45,63±4,62	66,75±4,02	61,75±3,31	F(1,28)= 9,36*	F(1,28)= 0,26	F(1,28)= 1,10	SHR < SLA16
Tempo médio por visita ao centro (seg)	3,52±0,48	2,74±0,47	2,40±0,14	2,25±0,25	F(1,28)= 4,88*	F(1,28)= 1,64	F(1,28)= 0,72	
Tempo médio por visita à periferia (seg)	14,03±1,16	15,96±2,08	10,90±0,95	13,71±1,05	F(1,28)= 3,76	F(1,28)= 2,94	F(1,28)= 0,10	
<i>Climbing</i> (n)	25,6±1,8	24,0±1,4	27,50±2,41	27,63±1,58	F(1,28)= 2,25	F(1,28)= 0,16	F(1,28)= 0,22	---
<i>Rearing</i> (n)	26,13±2,48	21,63±3,80	36,71±1,19	34,13±2,96	F(1,27)= 16,32*	F(1,27)= 1,53	F(1,27)= 0,11	SHR < SLA16
<i>Grooming</i> (n)	4,38±0,98	4,88±0,72	4,38±1,08	4,75±0,65	F(1,28)= 0,01	F(1,28)= 3,24	F(1,28)= 0,01	---
Tempo de <i>grooming</i> (seg)	18,13±4,45	23,50±3,62	14,63±3,83	21,50±4,00	F(1,27)= 0,60	F(1,27)= 2,16	F(1,27)= 3,73	---
Latência: <i>grooming</i> (seg)	147,1±14,0	152,6±6,7	160,8±14,1	120,4±10,6	F(1,28)= 0,47	F(1,28)= 2,36	F(1,28)= 0,03	---
Tempo de <i>sniffing</i> (sec)	118,3±6,5	106,3±4,7	143,9±4,7	141,3±6,5	F(1,28)= 28,20*	F(1,28)= 1,63	F(1,28)= 0,66	SHR < SLA16
Defecação (n)	0,37±0,18	0,25±0,16	0,25±0,16	0,25±0,16	F(1,28)= 0,13	F(1,28)= 0,13	F(1,28)= 0,13	---

Ratos fêmeas *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) e SHR, LEW-Anxrr16 (SLA16) tratados com veículo (VEH) ou femproporex (FEN, 4mg/kg, i.p.) avaliados no teste de campo aberto por 5min. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (*p<0,05) com 8 animais em cada grupo. Teste ANOVA de duas vias seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Tabela 1 Efeito do tratamento de dose única de fenproporex (22±1h após a administração) em ratos fêmeas no teste de labirinto em cruz elevado

	SHR		SLA16		Two-way ANOVA			Resultados
	Veículo	Fenproporex	Veículo	Fenproporex	Linhagem	Tratamento	Interação	
Distância total (m)	10,24±0,36	10,84±0,54	12,58±1,05	11,72±0,60	F(1,27)= 5,16*	F(1,27)= 0,03	F(1,27)= 1,05	SHR < SLA16
Entradas no braço aberto (n)	13,1±1,3	14,9±1,2	15,4±0,7	15,0±1,0	F(1,28)= 1,21	F(1,28)= 0,40	F(1,28)= 0,97	---
Entradas no braço fechado (n)	9,1±0,6	10,0±0,9	10,8±1,6	10,1±1,1	F(1,27)= 0,57	F(1,27)= 0,01	F(1,27)= 0,42	---
Tempo no braço aberto (sec)	133,2±9,8	131,0±15,0	150,4±14,6	144,7±10,7	F(1,28)= 1,46	F(1,28)= 0,09	F(1,28)= 0,01	---
Tempo no braço fechado (sec)	123,8±11,1	121,8±14,2	103,4±10,6	111,1±11,0	F(1,28)= 1,73	F(1,28)= 0,05	F(1,28)= 0,16	---
% entradas no braço aberto	56,2±2,5	59,8±3,3	60,1±3,5	59,9±3,7	F(1,28)= 0,39	F(1,28)= 0,28	F(1,28)= 0,33	---
% entradas no braço fechado	43,8±2,5	40,2±3,3	39,9±3,5	40,1±3,7	F(1,28)= 0,39	F(1,28)= 0,28	F(1,28)= 0,33	---
% tempo no braço aberto	51,9±4,0	51,7±5,7	58,7±4,5	56,6±4,2	F(1,28)= 1,56	F(1,28)= 0,06	F(1,28)= 0,04	---
% tempo no braço fechado	48,1±4,0	48,3±5,7	41,3±4,5	43,4±4,2	F(1,28)= 1,56	F(1,28)= 0,06	F(1,28)= 0,04	---

APÊNDICE 3

Fêmeas SHR e SLA16 tratadas com dose única de FEN e testadas 15min após no CA e LCE

Tabela 1 Efeito do tratamento único de fenproporex (15 min após a administração) em ratos fêmeas no teste de campo aberto

	SHR		SLA16		Two-way ANOVA			Resultados
	Veículo	Fenproporex	Veículo	Fenproporex	Linagem	Tratamento	Interação	
	Distância total (m)	40,75±1,79	42,62±1,49	42,42±1,27	33,88±2,51	F(1,27)=3,58	F(1,27)=3,18	
Velocidade máxima (cm/seg)	0,59±0,02	0,56±0,01	0,65±0,03	0,46±0,03	F(1,27)=0,94	F(1,27)=19,89*	F(1,27)=10,44*	SLA16.FEN < todos
Entradas no centro (n)	22,00±2,56	27,50±1,46	28,88±2,50	22,13±1,52	F(1,28)=0,13	F(1,28)=0,09	F(1,28)=8,68*	SLA16.VEH > SHR.VEH / SLA16.VEH
Distância central (m)	10,61±1,27	12,53±0,84	12,08±0,81	10,02±0,82	F(1,28)=0,30	F(1,28)=0,01	F(1,28)=4,30*	---
Distância periférica (m)	30,14±0,89	30,08±1,38	30,31±0,93	23,86±2,32	F(1,27)=3,88*	F(1,27)=4,49*	F(1,27)=4,34*	SLA16.FEN < todos
Tempo no centro (seg)	51,21±7,06	69,33±5,44	60,50±5,09	67,56±4,13	F(1,27)=0,44	F(1,27)=4,99*	F(1,27)=0,96	VEH < FEN
Tempo na periferia (seg)	248,7±7,1	230,7±5,4	239,5±5,1	232,5±4,1	F(1,27)=0,44	F(1,27)=4,99*	F(1,27)=0,96	VEH > FEN
Movimentos verticais (n)	50,13±3,88	59,89±5,89	74,25±3,53	59,50±4,42	F(1,28)=6,89*	F(1,28)=0,30	F(1,28)=7,34*	SLA16.VEH > todos
Tempo médio por visita ao centro (seg)	2,32±0,15	2,53±0,17	2,10±0,07	3,58±0,65	F(1,27)=0,47	F(1,27)=12,17*	F(1,27)=4,34*	SLA16.FEN > todos
Tempo médio por visita à periferia (seg)	12,40±2,11	8,36±0,55	8,63±0,89	10,12±0,68	F(1,27)=0,01	F(1,27)=0,18	F(1,27)=4,85*	SHR.VEH > SHR.FEN / SLA16.VEH
Climbing (n)	28,38±1,19	25,13±1,37	33,71±1,02	20,25±2,40	F(1,27)=0,02	F(1,27)=26,40*	F(1,27)=9,86*	SLA16.FEN < todos; SLA16.VEH > todos
Rearing (n)	24,86±2,96	34,75±5,22	42,50±4,87	39,25±3,48	F(1,27)=6,52*	F(1,27)=0,58	F(1,27)=2,29	SLA16 > SHR
Grooming (n)	4,88±0,50	0,14±0,14	5,00±0,50	0,88±0,30	F(1,27)=1,33	F(1,27)=142,97*	F(1,27)=0,67	VEH > FEN
Tempo de grooming (seg)	21,50±4,71	0,29±0,29	14,00±3,33	2,13±1,14	F(1,27)=0,86	F(1,27)=29,48*	F(1,27)=2,34	VEH > FEN
Latência: grooming (seg)	155,5±9,0	297,0±3,0	154,6±20,7	260,3±20,0	F(1,27)=1,41	F(1,27)=61,35*	F(1,27)=1,28	VEH < FEN
Tempo de sniffing (seg)	108,6±3,8	97,8±4,3	136,0±4,9	128,2±4,0	F(1,27)=45,61*	F(1,28)=4,68*	F(1,28)=0,12	VEH > FEN; SLA16 > SHR
Defecação (n)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,1±0,1	F(1,28)=0,89	F(1,28)=0,89	F(1,28)=0,89	---

Ratos fêmeas SHR e SLA16 tratados com veículo (VEH) ou fenproporex (FEN, 4mg/kg, i.p.) avaliados no teste de campo aberto por 5min. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (*p<0,05) com 8 animais em cada grupo, Teste ANOVA de duas vias seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

Tabela 1 Efeito do tratamento único de fenproporex (15 min após a administração) em ratos fêmeas no teste de labirinto em cruz elevado

	SHR		SLA16		Two-way ANOVA			Resultados
	Veículo	Fenproporex	Veículo	Fenproporex	Linagem	Tratamento	Interação	
	Distância total (m)	14,13±0,87	14,03±1,02	12,40±0,99	10,53±1,43	F(1,28)=5,63*	F(1,28)=0,80	
Entradas no braço aberto (n)	14,9±1,0	14,3±1,7	13,8±0,8	14,8±3,1	F(1,28)=0,03	F(1,28)=0,01	F(1,28)=0,19	---
Entradas no braço fechado (n)	12,3±0,6	13,3±1,1	11,9±2,2	11,0±1,5	F(1,28)=0,80	F(1,28)=0,00	F(1,28)=0,41	---
Tempo no braço aberto (seg)	131,8±4,4	117,1±13,1	155,3±12,8	124,5±15,9	F(1,28)=1,57	F(1,28)=3,40	F(1,28)=0,42	---
Tempo no braço fechado (seg)	127,4±4,7	130,9±16,3	87,8±4,7	111,9±20,9	F(1,28)=4,59*	F(1,28)=1,03	F(1,28)=0,57	SHR > SLA16
% entradas no braço aberto	54,7±1,7	53,8±1,8	56,3±5,0	55,4±5,6	F(1,27)=0,16	F(1,27)=0,05	F(1,27)=0,01	---
% entradas no braço fechado	45,3±1,6	46,2±1,8	43,7±5,0	44,6±5,6	F(1,27)=0,16	F(1,27)=0,05	F(1,27)=0,01	---
% tempo no braço aberto	50,9±1,7	47,7±5,6	63,2±3,2	53,7±7,2	F(1,28)=2,37	F(1,28)=0,84	F(1,28)=1,18	---
% tempo no braço fechado	49,1±1,7	52,3±5,6	36,8±3,1	46,3±4,2	F(1,28)=2,37	F(1,28)=0,84	F(1,28)=1,18	---

Ratos fêmeas SHR e SLA16 tratados com veículo (VEH) ou fenproporex (FEN, 4mg/kg, i.p.) avaliados no teste de labirinto em cruz elevado por 5min. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (*p<0,05) com 8 animais em cada grupo, Teste ANOVA de duas vias seguido por teste de comparação de médias de Duncan.

APÊNDICE 4

Trabalho publicado na revista *Alcohol*

ANJOS, P.A.R.; MARCHETTE, R.C.N.; KREMER, R.; GRANZOTTO, N.; ALVES, T.M.; FADANNI, G.P.; MAZUR, F.G.; ANTON, E.L.; DA SILVA-SANTOS, J.E.; LINDER, Á.E.; IZÍDIO, G.S. The influence of chromosome 4 on high ethanol consumption and blood pressure. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, v. 102, p. 1–10, Aug. 2022.



ELSEVIER

Alcohol 102 (2022) 1–10

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Alcohol

journal homepage: <http://www.alcoholjournal.org/>



The influence of chromosome 4 on high ethanol consumption and blood pressure

Pâmela Andressa Ramborger Anjos ^{a,1}, Renata Cristina Nunes Marchette ^{a,d,1},
Rafael Kremer ^{b,c}, Natalli Granzotto ^a, Thalita Mello Alves ^b, Guilherme Pasetto Fadanni ^{a,b},
Fernando Gabriel Mazur ^b, Elaine Leocádia Anton ^a, José Eduardo da Silva-Santos ^a,
Áurea Elizabeth Linder ^a, Geison Souza Izídio ^{a,b,*}

^a Department of Pharmacology – Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil
^b Department of Cellular Biology, Embryology, and Genetics – Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil
^c Department of Medicine – Federal University of Fronteira Sul, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil
^d Neurobiology of Addiction Section, Integrative Neuroscience Branch, National Institute on Drug Abuse Intramural Program, Baltimore, MD, United States



ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 October 2021
Received in revised form 6 April 2022
Accepted 18 April 2022

Keywords:
Alcoholism
Congenic rats
Hypertension
Losartan

ABSTRACT

The Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) strain was developed through selective breeding for high systolic blood pressure. In our laboratory, we established a congenic rat strain named SHR.Lewis-*Anxrr16* (SLA16). The SLA16 rat strain is genetically identical to the SHR except for the inserted *Anxrr16* region in chromosome 4. Our objective was to evaluate the influence of this genomic region on ethanol consumption and blood pressure. First, we exposed SHR and SLA16 male and female rats to ethanol consumption. Results showed that, regardless of strain, females consumed more ethanol than males during forced (10% v/v) and spontaneous ethanol consumption (SEC; 2.5–20% v/v). Then, females from both strains were used to evaluate sensitivity to ethanol. No strain differences in the loss of righting reflex were observed after ethanol treatment (3 g/kg, 20% w/v, intraperitoneal [i.p.]). But, in the triple test, female SHR rats presented lower sensitivity to the ethanol (1.2 g/kg, 14% w/v, i.p.). Surprisingly, female SHR rats also presented higher blood pressure after SEC (10% v/v). Finally, losartan treatment was effective in decreasing the blood pressure of female rats of both strains, but had specific effects on SHR ethanol consumption. Our data suggest that SLA16 female rats consume less ethanol (10%), are more sensitive to its effects, and present lower blood pressure than SHR female rats. We demonstrated that the *Anxrr16* locus in chromosome 4 is a genetic candidate to explain high ethanol consumption and blood pressure, at least in females.

© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Alcohol use disorders are multi-factorial and are associated with increased morbidity and mortality. Studies based on family history, monozygotic and dizygotic twins, and adopted individuals reported the involvement of genetic factors in the etiology of alcohol use disorders, with a heritability of over 50% (Agrawal & Lynskey, 2008;

Köhnke, 2008; Long, Verhulst, Aggen, Kendler, & Gillespie, 2017; Verhulst, Neale, & Kendler, 2015).

However, it has been challenging to individually investigate the influence of biological (sex-related), socio-cultural (gender-related), emotional (specific mood changes), and genetic (genes) factors on humans' ethanol misuse and abuse (Erol & Karpyak, 2015). Therefore, since in preclinical research it is possible to isolate variables and impose treatments, strains of rats characterized by high and low ethanol consumption have been used for these purposes: AA (Alko Alcohol) and ANA (Alko Non-alcohol) (Eriksson, Etelälahti, & Apter, 2017); HAD (High Alcohol-Drinking) and LAD (Low Alcohol-Drinking) (Krimmer & Schechter, 1992; McBride, Rodd, Bell, Lumeng, & Li, 2014); P (Alcohol-preferring) and NP (Alcohol-nonpreferring) (Bice et al., 1998; Carr et al., 1998);

* Corresponding author. Behavioral Genetics Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Biological Sciences Center Cellular Biology, Embryology and Genetics Department, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil. Telephone: +55 48 3721 2816 Fax: +55 48 3721 5148.
E-mail address: g.izidio@ufsc.br (G.S. Izídio).
¹ Shared co-first authorship.

<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2022.04.004>
0741-8329/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

APÊNDICE 5

- Trabalho publicado na revista *Current Neuropharmacology*

RAMOS, A.; GRANZOTTO, N.; KREMER, R.; BOEDER, A.M.; DE ARAÚJO, J.F.P.; PEREIRA, A.G.; IZÍDIO, G.S. Hunting for genes underlying emotionality in the laboratory rat: maps, tools and traps. *Current neuropharmacology*, v. 21, n. 9, p. 1840–1863, 2023.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Neuropharmacology, XXXX, XX, XX-XX

1

REVIEW ARTICLE

Hunting for Genes Underlying Emotionality in the Laboratory Rat: Maps, Tools and Traps

André Ramos^{1,*}, Natalli Granzotto^{1,2}, Rafael Kremer^{1,3}, Ariela Maína Boeder^{1,2}, Julia Fernandez Puñal de Araújo^{1,3}, Aline Guimarães Pereira^{1,3} and Geison Souza Izídio^{1,2,3}

¹Behavior Genetics Laboratory, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics; ²Graduate Program of Pharmacology and ³Graduate Program of Developmental and Cellular Biology, ^{1,2,3}Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Abstract: Scientists have systematically investigated the hereditary bases of behaviors since the 19th century, moved by either evolutionary questions or clinically-motivated purposes. The pioneer studies on the genetic selection of laboratory animals had already indicated, one hundred years ago, the immense complexity of analyzing behaviors that were influenced by a large number of small-effect genes and an incalculable amount of environmental factors. Merging Mendelian, quantitative and molecular approaches in the 1990s made it possible to map specific rodent behaviors to known chromosome regions. From that point on, Quantitative Trait Locus (QTL) analyses coupled with behavioral and molecular techniques, which involved *in vivo* isolation of relevant blocks of genes, opened new avenues for gene mapping and characterization. This review examines the QTL strategy applied to the behavioral study of emotionality, with a focus on the laboratory rat. We discuss the challenges, advances and limitations of the search for Quantitative Trait Genes (QTG) playing a role in regulating emotionality. For the past 25 years, we have marched the long journey from emotionality-related behaviors to genes. In this context, our experiences are used to illustrate why and how one should move forward in the molecular understanding of complex psychiatric illnesses. The promise of exploring genetic links between immunological and emotional responses are also discussed. New strategies based on humans, rodents and other animals (such as zebrafish) are also acknowledged, as they are likely to allow substantial progress to be made in the near future.

ARTICLE HISTORY

Received: March 30, 2022
Revised: June 13, 2022
Accepted: July 28, 2022

DOI:
10.2174/1570159X20666220901154034

Keywords: Behavior genetics, anxiety, hyperactivity, linkage analysis, quantitative trait loci, quantitative trait genes, rats.

1. INTRODUCTION

Let us be honest: identifying genes influencing phenotypes that vary continuously within any given species is long, arduous and risky. If some of us thought otherwise, we were probably excessively excited with the possibility of merging, for the first time, Mendelian, quantitative and molecular genetic strategies back in the early 1990s. Perhaps we were not paying enough attention to our history lessons in such a promising conceptual and methodological context. We were (and we are), indeed, a privileged generation, for having, at last, the technological means of explaining biologically some of the fundamental phenomena that the founders of Genetics could only explain mathematically (and often with little consensus). Had Gregor Mendel chosen, in his famous hybridization experiments with peas [1], seven

continuous variables instead of seven easily classifiable characteristics and maybe the science of heredity would have to wait for a few more decades before coming to light.

Studies on the inheritance of continuous variation had started long before the official dawn of Genetics. Darwin's cousin, Francis Galton, produced much of the statistical and conceptual bases for Biometrics after the publication of Mendel's seminal work, but before its discovery in 1900 [2]. In those years, but also in the first decades of the 20th century, heated debates attempted to determine whether continuously varying traits were compatible or not with the evolutionary effects of natural selection [3]. Mendelian patterns of inheritance seemed to support the "mutationist" notion that quantitative characters, when influenced by selection, could not produce long-lasting and ever-progressing changes. For example, the Danish botanist Wilhelm Johannsen, one of the founders of Genetics and the creator of the terms "phenotype" and "genotype", provided clear-cut evidence that both genetic and environmental factors underlay continuous biological variables, such as the weight of bean seeds. Neverthe-

*Address correspondence to this author at the Behavior Genetics Laboratory, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88.040-900, Brazil; Tel: +55 (48) 991510970; E-mail: deavilaramos@gmail.com

APÊNDICE 6

- Revisão bibliográfica a ser submetida

Physical activity or exercise as an alternative treatment for attention deficit hyperactivity disorder: studies with humans and experimental animals

Rafael Kremer e Geison Souza Izídio

Abstract: This review looks at some of the benefits of physical activity (PA) or physical exercise (PE) and its prospects for preventing, treating or improving the quality of life of people with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). We will comment on the various scientific evidences gathered from different studies carried out on human beings, or even on experimental animals which are models of this disorder. A genetic or molecular approach has been taken because of the recent scientific perspectives and advances that have been made in the field of ADHD research, which are inseparable from current molecular research.

Keywords: ADHD; physical activity; physical exercise; alternative treatment

ADHD in humans – Prevalence

ADHD is one of the most common and challenging psychiatric conditions seen in children and adolescents. It is more commonly diagnosed in boys than in girls, and the global prevalence among people under the age of 18 is believed to be between 5.6 and 7.2% (POLANCZYK et al., 2007; THOMAS et al., 2015). It is estimated that at least some of these children or adolescents will continue to show symptoms or be diagnosed with this disorder in adulthood (FAYYAD et al., 2017; SIMON et al., 2009).

The prevalence of ADHD in children and adolescents is estimated differently in different countries and cultures (SKOUNTI et al., 2007). For example, a prevalence of ADHD of 6.1% has been observed in children and adolescents in Germany (BACHMANN et al., 2017), 6.3% in India (CHAUHAN et al., 2022), 6.4 to 7.5% (urban and rural areas, respectively) in China (LIU et al., 2018; PANG et al., 2021) and 9.4% in the United States (DANIELSON et al., 2018). In addition to regional characteristics and specificities, this variation in prevalence is largely attributable to the diversity of methodologies used to delimit the investigated population and establish diagnostic criteria (CARDO et al., 2011; GUARDIOLA et al., 2000; KIM et al., 2020; POLANCZYK et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2003). For example, in an international context, studies that adopted the criteria of the Fifth Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V) for diagnosing ADHD showed a higher number of people being diagnosed than in previous editions (GHANIZADEH, 2013; KIM et al., 2020). In Brazil, unfortunately, research into the prevalence of ADHD has been insufficient, since there are no comprehensive studies that include representative samples of the entire population, but rather isolated surveys in specific schools or communities. In this sense, Fontana et al. (2007), together with teachers and parents, carried out diagnostic screenings on 461 students, aged 6 to 12, in four public schools in Rio de Janeiro using the DSM-IV, where a prevalence of 13% of ADHD was found. Oliveira et al. (2016) analyzed 265 children and adolescents aged between 10 and 17 using the DSM-V