

María Elisa Corvino

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR
DOPAMINÉRGICO D2 NAS DIFERENÇAS
COMPORTAMENTAIS, RELACIONADAS À
ANSIEDADE/EMOCIONALIDADE, DAS LINHAGENS SHR E
SLA16.**

Dissertação submetido(a) ao
Programa de Pós-graduação
de Biologia Celular e do
Desenvolvimento da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do
Grau de mestre em Biologia
Celular e do Desenvolvimento
Orientador: Prof. Dr. Geison
Souza Izídio

Florianópolis
2015

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

Corvino, Maria Elisa

Investigação da participação do receptor dopaminérgico D2 nas diferenças comportamentais, relacionadas à ansiedade/emocionalidade, das linhagens SHR e SLA16. / Maria Elisa Corvino ; orientador, Geison Souza Izidio - Florianópolis, SC, 2015.

90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Receptor dopaminérgico D2. 3. SHR e SLA16. 4. Ansiedade. 5. Emocionalidade. I. Izidio, Geison Souza . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

"Investigação da participação do receptor dopaminérgico D2 nas diferenças comportamentais, relacionadas à ansiedade/emocionalidade, das linhagens SHR e SLA16"

Por

Maria Elisa Corvino

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (022/PPGBCD/2015) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.

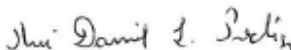


Prof(a). Dr(a). Yara Maria Rouh Müller
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:



Dr(a) Geilson de Souza Inácio (BEG/CCB/UFSC)
Orientador(a)



Dr(a) Rui Daniel Schröder Prediger (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Elayne Rereira (UNISUL)



Dr(a) Yara Costa Netto Müller (BEG/CCB/UFSC)

Florianópolis, 14 de agosto de 2015.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao meu orientador, o Prof. Dr. Geison Souza Izídio por ter me recebido no laboratório de Genética do Comportamento e ter me dado a oportunidade de fazer meu mestrado com ele. Obrigada pela paciência e a confiança em cada fase atravessada.

Quero agradecer também ao Prof. Dr. André Ramos por ter me recebido no laboratório. Por ter me convidado a ser parte do Projeto Imagine, uma experiência que não imaginei possível quando decidir vir a Florianópolis.

Um agradecimento especial também para a Dra. Renata Pértile, pela grande contribuição inclusive na parte experimental do presente trabalho.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger pela grande contribuição na parte molecular neste projeto.

A Dra. Eloisa Pavesi e A Renata Marchette pela contribuição neste projeto, pela constante ajuda de vocês. Obrigada pela paciência, pelos “brain storms” sempre tão interessantes e produtivos, pelo tempo e principalmente pela amizade!! Levo vocês no meu coração para sempre.

A minha família que sempre me apoia e me acompanha na distância. Meus pais por terem me ajudado tanto ao longo da minha vida para que hoje seja quem sou. Minha irmã Noe pelas conversas intermináveis que faziam que a saudade não doesse tanto. Minha irmã Carla, por ter me orientado sempre a tomar decisões e ajudado a me dar conta que as coisas nem sempre são complicadas. Meu irmão Ignacio, por ser tão único, companheiro.

Aos meus colegas do laboratório, em especial a Lucia, Fernanda, Fernando, Katia, Paula, Naty e Pamela que fizeram que o fato de estar longe de casa não seja tão difícil. Obrigada pelo carinho e a disposição a me ajudar.

A minha amiga Lucia e minha sobrinha Martina, por fazer desta ilha um lugar divertido, alegre e cheio de amor quando todo o resto parece ser hostil. Obrigada por me ajudar a retornar ao caminho e pela amizade de sempre. Obrigada a Margarita por ser quase uma mãe para mim, obrigada pelos mates, pelas conversas e os momentos compartilhados. Obrigada pela comida argentina.

As minhas amigas, Mariana Silveiro e Maiara Bruscos de Freitas, por fazer que o 103 seja o melhor apartamento da ilha. Obrigada pela parceria, pela sinceridade, a honestidade e por me presentear com sua

amizade. Certamente vocês tem um lugar no meu coração para sempre, espero que a vida nos junte novamente. Obrigada.

Aos membros da comissão do Mestrado, Prof. Dra. Evelise Nazzari, Prof. Dra. Zenilda Bouzon, Prof. Dr. Rafael Rosa e o Prof Dr. Geison, pela oportunidade, e por ter compartilhado comigo a experiência de ser parte de um processo acadêmico tão importante.

Aos professores da pós-graduação de Biologia Celular e do Desenvolvimento e de Farmacologia.

Quero agradecer ao Prof. Dr. André Ramos o Prof. Dr. Paulo Hoffman e o Prof Dr. Guilherme Razzera e a toda equipe do projeto Imagine, por ter me ensinado o grande valor e a importância do respeito a todos os seres humanos, sem importar cor, pais ou religião, todos devemos ser tratados com respeito e de igual maneira. Obrigada por compartilhar comigo os conhecimentos e as ferramentas na hora de ensinar. Obrigada a Dr. Jorge, Tomas, Gabriela, Marina, Felipe, Barbara, Flecki, pela amizade, pela companhia em cada experiência vivida, pela parceria e ajuda constante!!

Um agradecimento especial aos membros da banca Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, Prof. Dra. Elayne Pereira, Prof. Dra. Yara Costa Netto Muniz e o Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa por ter aceitado corrigir meu trabalho.

Finalmente agradecer aos apoios financeiros CAPES e a UFSC, pelo auxílio na minha formação.

RESUMO

Em um estudo utilizando as linhagens LEW e SHR foi descrita a região do cromossomo 4, *Anxrr16*. O estudo mostrou que essa região influencia a locomoção central no teste do Campo Aberto. A fim de melhor compreender a importância da região *Anxrr16* nos comportamentos, foi desenvolvida uma linhagem congênica a partir das linhagens SHR e LEW, chamada SLA16 (SHR.LEW-*Anxrr16*). O gene da alfa-sinucleína (Snca) localizado na região do *Anxrr16* codifica uma proteína que inibe a atividade do transportador da dopamina e a síntese da dopamina nos neurônios dopaminérgicos. O objetivo do presente estudo foi investigar o papel da região diferenciada entre as linhagens SHR e SLA16, *Anxrr16*, na regulação do sistema dopaminérgico em comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade. Foram utilizados animais das linhagens SHR e SLA16, que receberam o tratamento com duas doses de agonista D2, Quimpirole (1.5 mg/kg e 3mg/kg), e duas doses do antagonista preferencial do receptor D2, Haloperidol (0.25 mg/kg e 0.5 mg/kg). Os tratamentos foram administrados IP e através de microinjeções na região ventral do hipocampo. O tratamento periférico com Quimpirole mostrou efeitos farmacogenéticos nas linhagens SHR e SLA16, provocando uma diminuição da locomoção total dos animais das duas linhagens no LCE, ou da linhagem SLA16 no CA. Ele também parece influenciar nos comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade aumentando a preferência pelas áreas aversivas nos testes comportamentais avaliados. Já o tratamento no hipocampo ventral causou uma diminuição da locomoção dos animais das duas linhagens no CA e LCE. O tratamento periférico com Haloperidol provocou efeitos farmacogenéticos específicos nas linhagens SHR e SLA16, diminuindo somente a locomoção da linhagem SLA16 no CA, enquanto que o tratamento no hipocampo ventral não influenciou a locomoção ou os comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade. Os resultados sugerem que os receptores dopaminérgicos D2 destas linhagens influenciam nos comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade quando estimulados com agonistas IP. A região diferencial (*Anxrr16*) entre as linhagens SHR e SLA16 pode conter genes reguladores do sistema dopaminérgico que causaram o efeito farmacogenético encontrado, em resposta a drogas que atuam no receptor D2.

PALAVRAS CHAVE

Hipocampo ventral, Dopamina, Haloperidol, Quimpirole, Testes comportamentais.

ABSTRACT

In a study using the LEW and SHR strains was described that the region of chromosome 4, *Anxrr16*, influences the central locomotion in the Open Field test. In order to better understand the importance of *Anxrr16* region on behaviors, a congenic strain from SHR and LEW rats, named SLA16 (SHR.LEW-*Anxrr16*), was developed. The gene of alpha-sinuclein localized in the *Anxrr16* region codified a protein (Snca) that inhibits the dopamine transporter activity and the dopamine synthesis in dopaminergic neurons. The aim of this work was investigated the role of the *Anxrr16* region on the regulation of the dopaminergic system in anxiety/emotionality related behaviors. Animals of SHR and SLA16 strains were treated with two dose of agonist of D2 receptor, Quimpirole (1.5 mg/kg and 3.0 mg/kg) and two dose of antagonist of D2 receptor, Haloperidol (0.25 mg/kg and 0.5 mg/kg). Treatments were administered through IP injection and microinjected in ventral hippocampus. Peripheral treatment with the D2 agonist showed pharmacogenetic effects in SHR and SLA16 strains, causing, in general, decreased mobility of the strains in EPM or in the SLA15 strain in the OF. It also appears to influence behaviors related to anxiety/emotionality since the preference for aversive areas was increased. Treatment in the ventral hippocampus caused a decrease of locomotion of both strains in both behavior tests. Peripheral treatment with the dopamine D2 receptor antagonist caused a pharmacogenetic effect decreasing the locomotion only in SLA16 animals in the OF whereas treatment in the ventral hippocampus did not influence the behavior or locomotion related to anxiety/emotionality. The results suggest that dopamine D2 receptor of these strains influence behaviors related to anxiety/emotionality when stimulated with agonists IP. The differential region (*Anxrr16*) between SHR and SLA16 strains possibly contain genes, regulating the dopaminergic system that caused the pharmacogenetic effect found in response to drugs that act on the D2 receptor.

KEYWORDS

Ventral Hippocampus, Dopamine, Haloperidol, Quimpirole, Behavioral Test

LISTA DE ABREVIACÕES

AC = Adenil ciclase
Anxrr16= QTL 16 Região relacionada à Ansiedade (*do inglês Anxiety related response QTL 16*)
cAMP= Monofosfato cíclico de Adenosina
CA= Campo Aberto
CBP= Caixa Branca e Preta
COMT = Catecol-O-metiltransferase
DA= Dopamina
DAT= Transportador de Dopamina
DOPAC= Ácido 3,4- Dihidroxifenilacético
DSM-IV= Manual de Diagnostico e Estatística dos trastornos mentais IV
HEP= Linhagem alta preferencia por etanol (*do inglês high-ethanol preferring line*)
IP= intraperitoneal
iP= Linhagem isogênica Preferencia (*do inglês inbred preferring*)
iNP= linhagem isogênica Não preferencia (*do inglês inbred non-preffering*)
L-DOPA= L-di-hidroxifenilalanina
LCE= Labirinto em Cruz Elevado
LEW= Lewis
MAO = Monoamina oxidase
NP= Não preferencia por álcool (*do inglês alcohol-nonpreffering*)
P= Preferencia por álcool (*do inglês alcohol-preffering*)
QTL= Locus para característica Quantitativa (*do inglês Quantitative Trait Locus*)
RGD= Banco de dados do Genoma do Rato (*do inglês Rat Genome Database*)
SHR = Rato Espontaneamente hipertenso (*do inglês Spontaneous Hypertensive Rats*)
SLA16= SHR.LEW-Anxrr16
SNC= Sistema Nervoso Central
Sncα= gene da alfa-sinucleína
SNP= Polimorfismo de nucleotídeo único
TH= Tirosina hidroxilase
VTA= Área tegmental ventral
WKY= Wistar-Kyoto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do refinamento genético da região <i>Anxrr16</i>	6
Figura 2. Neurônio dopaminérgico pré-sináptico.....	11
Figura 3. Aparato utilizado no teste do Campo Aberto.....	15
Figura 4. Aparato utilizado no teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	16
Figura 5. Análises histológicas da posição das cânulas.....	20
Figura 6. Locomoção central e periférica no CA após administração IP de Quimpirole.....	24
Figura 7. Locomoção total e porcentagem de locomoção central do CA após administração IP de Quimpirole.....	25
Figura 8. Tempo gasto no centro e na periferia do CA após administração IP de Quimpirole.....	26
Figura 9. Número de entradas nos braços abertos e fechados do LCE após administração IP de Quimpirole.....	27
Figura 10. Tempo gasto nos braços abertos e fechados do LCE após administração IP de Quimpirole.....	28
Figura 11. Locomoção central e periférica no CA após administração Intrahipocampal de Quimpirole.....	29
Figura 12. Locomoção total e porcentagem da locomoção central no CA após administração Intrahipocampal de Quimpirole.....	29
Figura 13. Tempo gasto no centro e na periferia do CA após administração Intrahipocampal de Quimpirole.....	30
Figura 14. Número de entradas nos braços abertos e fechados no LCE após administração Intrahipocampal de Quimpirole.....	31
Figura 15. Tempo gasto nos braços abertos e nos braços fechados no LCE após administração Intrahipocampal de Quimpirole.....	32
Figura 16. Locomoção central e periférica do CA após administração IP de Haloperidol.....	34
Figura 17. Locomoção total e porcentagem da locomoção central no CA após administração IP de Haloperidol.....	35
Figura 18. Tempo gasto no centro e na periferia do CA após administração IP de Haloperidol.....	36
Figura 19. Número de entradas nos braços abertos e fechados do LCE após administração IP de Haloperidol.....	37
Figura 20. Tempo gasto nos braços abertos e fechados, distância percorrida e velocidade no teste LCE após administração IP de Haloperidol.....	38
Figura 21. Locomoção central e periférica no CA após administração Intrahipocampal de Haloperidol.....	39

Figura 22. Locomoção total e porcentagem da locomoção central no CA após administração Intrahipocampal de Haloperidol.....	39
Figura 23. Tempo gasto no centro e na periferia do CA após administração Intrahipocampal de Haloperidol	40
Figura 24. Número de entradas nos braços abertos e fechados, tempo gasto nos braços abertos e fechados no LCE após administração Intrahipocampal de Haloperidol.....	41
Figura 25. Quantificação por Western Blot dos receptores da família D2 no hipocampo de animais naive das linhagens SHR e SLA16.....	43
Figura 26. Quantificação por Western Blot do DAT no hipocampo de animais naive das linhagens SHR e SLA16.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. N° total de animais das linhagens SHR e SLA16 que passaram pela cirurgia estereotáxica para implantação das cânulas bilaterais.....	18
Tabela 2. Animais utilizados para cálculo das variáveis depois da análise histológica de localização das cânulas no hipocampo de animais das linhagens SHR e SLA16	21
Tabela 3. Resumo gráfico do tratamento IP e Intrahipocampal com Quimpirole nas linhagens SHR e SLA16. Resultados obtidos das medidas avaliadas para CA e para LCE. (traço indica que não houve mudança; seta para baixo indica diminuição; seta para cima indica aumento).....	33
Tabela 4. Resumo gráfico do tratamento IP e Intrahipocampal com Haloperidol nas linhagens SHR e SLA16. Resultados obtidos das medidas avaliadas para os testes de CA e para LCE (traço indica que não houve mudança; seta para baixo indica diminuição; seta para cima indica aumento).....	42

ARTIGOS E RESUMOS ORIGINADOS POR ESTE TRABALHO:

Artigos científicos:

DE MEDEIROS, G. F.; CORREA, F. J.; **CORVINO, M. E.**; IZÍDIO, G. S.; RAMOS, A. The Long Way from Complex Phenotypes to Genes: The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects. *World Journal of Neuroscience*, v. 04, p. 203-215, 2014.

CORVINO, M. E.; PERTILE, R. A. N.; MARCHETTE, R. N.; CORREA, F. J.; IZÍDIO, G. S. Participation of D2 receptor in the behavioral differences of SHR and SLA16 rat strains. Em preparação.

Resumos em congressos:

Granzotto, N.; **Corvino ME**, Fernanda JC, Izídio, GS. Pharmacogenetic differences found between SHR and SLA16 rat strains in responses to D2 dopaminergic drugs. The International Brain Research Organization (IBRO), Rio de Janeiro, 2015.

Corvino ME; Fernanda JC; Pertile, RAN; Ramos, A; Izídio, GS. SLA16 and SHR rat strains showed differential responses in pharmacological studies using dopamine d2 receptor antagonist. Sociedade Brasileira de Neurociencias. SBNeC. Búzios, 2014.

Corvino ME, Taniguchi, J.G.; Dias, P.G.; Corrêa, F.J.; Acuña, L.R.; Ramos, A.; Pértile, R.A.N.; Izídio, G.S. A influência do ciclo estral em medidas comportamentais relacionadas à ansiedade/emocionalidade em ratos SLA16 e SHR. IV Simpósio em Neurociências, UFF, Niteroi, 2013.

Tabela de conteúdo

1. Introdução	1
1.1. EMOCIONALIDADE	1
1.2. MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DA ANSIEDADE	2
1.3. IMPORTÂNCIA DO CROMOSSOMO 4 E A DESCOBERTA DO ANXRR16	3
1.4. LINHAGENS CONGÊNICAS (SHR.LEW-ANXRR16)	5
1.5. SISTEMA DOPAMINÉRGICO	7
1.5.1 RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS	10
2. Hipótese principal do estudo	13
3. Objetivo geral	13
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4. Materiais e métodos	14
4.1. ANIMAIS.....	14
4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS	14
4.2.1 campo aberto (CA)	14
4.2.2. Labirinto em cruz elevado (LCE)	15
4.3. INJEÇÕES INTRAPERITONEAIS DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2	16
4.3.1. Injeção intraperitoneal de quimpirole	16
4.3.2. Injeção intraperitoneal de haloperidol	17
4.4. INJEÇÕES INTRAHIPOCAMPAL DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2	17
4.4.1. Cirurgias estereotáxicas	17
4.4.2. Microinjeções intrahipocampais	19
4.5. WESTERN BLOT	21
4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	22
5. Resultados	23
5.1.0 INJEÇÃO INTRAPERITONEAL E INTRAHIPOCAMPAL DE AGONISTA D2: QUIMPIROLE	23
5.1.1. Quimpirole intraperitoneal-ca	23
5.1.2. Quimpirole intraperitoneal - lce	26
5.1.3. Quimpirole intrahipocampal- ca	28
5.1.4. Quimpirole intrahipocampal-lce	30
5.2.0. INJEÇÃO INTRAPERITONEAL E INTRAHIPOCAMPAL DE ANTAGONISTA D2:	33
5.2.1. Haloperidol intraperitoneal-CA	33
5.2.2. Haloperidol intraperitoneal-LCE	36
5.2.3. Haloperidol intrahipocampal- CA	38

5.4.2. Haloperidol intrahipocampal - LCE.....	40
5.5.0. QUANTIFICAÇÃO POR WESTERN BLOT DO RECEPTOR D2 E DAT NO HIPOCAMPO DAS LINHAGENS SHR E SLA16.....	42
5.5.1. Quantificação de d2	43
5.5.2. Quantificação de dat <80	44
6. Discussão	45
QUANTIFICAÇÃO DOS RECEPTORES DA FAMÍLIA D2 E DO TRANSPORTADOR DE DA NO HIPOCAMPO DE ANIMAIS DAS LINHAGENS SHR E SLA16	55
7. Conclusões.....	57
8. Referências bibliograficas.....	58
ANEXO I.....	69
ANEXO II	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. EMOCIONALIDADE

Ao longo da história, as diversas tentativas acerca de estabelecer quais fatores influenciam nas emoções levaram a diversas teorias principais existentes hoje. Todas elas baseiam-se na fisiologia, na cognição e na interação de fatores físicos e mentais. A primeira teoria conhecida foi a Teoria de James-Lange, proposta separadamente por Williams James e Carl Lange. Eles definiram a emoção como o resultado da interpretação de mudanças fisiológicas ocorridas anteriormente, sugerindo que a emoção é uma resposta experimentada após serem reconhecidas essas mudanças fisiológicas. Desta maneira, a teoria reconhece o sistema nervoso periférico como o fator principal na emocionalidade (James, 1884; Lange, 1885).

Em 1927, Walter Cannon baseado em diversos estudos próprios e de outros cientistas contemporâneos criticou a teoria de James-Lange e, junto com Phillip Bard, sugeriu uma nova definição de emoção. A teoria de Cannon-Bard propõe que perante uma situação que afeta um indivíduo, será gerada uma resposta emocional a partir de um centro que processa a informação, e pela ativação das funções fisiológicas que acompanham a resposta comportamental. Essa teoria inclui o suposto de que as mesmas reações fisiológicas podem ser expressas em diferentes emoções. Neste caso, a interpretação do estímulo é realizado pelo sistema nervoso autônomo (Cannon, 1927).

Posteriormente, o neuroanatomista James Papez mostrou que as emoções não são resultado do processamento em estruturas cerebrais específicas e sim de um circuito neuronal que envolve estruturas como o hipotálamo, o giro cingulado e o hipocampo; e que essas estruturas estão interconectadas por feixes nervosos (Papez, 1937). Este circuito conhecido como circuito de Papez foi base nos estudos de McLean (1952) que propõe pela primeira vez a nomenclatura do sistema límbico e adiciona diversas estruturas ao sistema, dentre elas a amígdala (revisado por Rajmohan & Mohandas, 2007). Com base em suas observações, Schachter e Singer (1962) sugeriram que são necessários dois fatores para constatar a existência de uma emoção. Se por um lado, é necessária uma ativação fisiológica indeterminada, por outro, deve existir uma avaliação cognitiva da situação (Schachter e Singer, 1962). A necessidade de que existam dois fatores para constatar uma emoção

conciliam de alguma maneira, as duas teorias que em princípio eram opostas. Assim, a definição mais ampla de emoção ou emocionalidade refere-se como uma experiência subjetiva que é induzida por mudanças externas e internas e que resulta em uma resposta comportamental complexa.

Devido ao fato que, as estruturas do sistema límbico que mediam diversos aspectos da emoção estão altamente conservadas nos vertebrados (Butler e Hodos, 2005), e a que as estruturas envolvidas no processamento cognitivo das respostas comportamentais também são conservadas, podemos estudar transtornos que são próprios dos humanos em diferentes modelos animais em laboratório.

1.2. Modelos animais no estudo da ansiedade

Embora a ansiedade e o medo sejam emoções normais caracterizadas por ter um grande valor adaptativo, o medo pode ser definido como uma resposta frente a uma ameaça real, enquanto que a ansiedade não tem uma causa evidente. Em termos biológicos, a ansiedade pode ser definida como um conjunto aumentado de respostas fisiológicas e comportamentais em indivíduos diante de uma situação virtualmente perigosa. Em contraste à ansiedade que é considerada como uma emoção normal e adaptativa, os transtornos de ansiedade causam prejuízos na qualidade de vida das pessoas que deles sofrem. Segundo o DMS-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), os transtornos de ansiedade compreendem: a ansiedade generalizada, o transtorno obsessivo compulsivo, transtorno de pânico, estresse pós-traumático, transtorno por perda, transtorno opositor desafiante, transtorno de ansiedade social, transtorno de personalidade e diversos tipos de fobias (DMS-V, 2013).

A constante busca pelo entendimento das bases neurobiológicas dos transtornos psiquiátricos fez necessário o estabelecimento de modelos de estudo animal. Assim, ratos e camundongos são normalmente utilizados devido a sua semelhança fisiológica e anatômica com humanos (Bryda, 2013). Segundo o Rat Genome Database (RGD), existem hoje mais de mil linhagens de ratos estabelecidas, que são utilizadas nos mais diversos estudos, desde doenças cardiovasculares (Kodavanti et al., 2000) e artrite (Tretham et al., 1977), até modelos animais para estudos comportamentais. Por exemplo, a linhagem SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) é considerada um bom modelo de estudo do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (Sagvolden T. , 2000) e as linhagens conhecidas como P

(Preferring) e NP (Non-preferring) são um bom modelo para o consumo de etanol (Bice et al., 1998). Um trabalho publicado por Ramos e colaboradores em 1997, utilizando seis linhagens de ratos diferentes, avaliou as respostas comportamentais em situações consideradas aversivas e demonstrou que os fenômenos biológicos podem ser avaliados através de uma série de testes comportamentais sugerindo uma importância dos fatores genéticos neste tipo de estudo. Ainda no mesmo trabalho, Ramos et al. (1997) propuseram as linhagens SHR e LEW (Lewis) como um modelo útil no estudo da ansiedade, pois estas duas linhagens mostraram respostas contrastantes em medidas clássicas usadas para comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade. A linhagem SHR sempre apresentou menores níveis de ansiedade no Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Caixa Branca e Preta (CBP) quando comparada com a linhagem LEW. Uma grande diferença foi observada no teste do CA, onde a locomoção central da linhagem SHR foi maior que a mostrada pela linhagem LEW. Porém, a locomoção total das linhagens não apresentou diferenças significativas (Ramos et al., 1997). A importância do modelo SHR-LEW para o estudo dos comportamentos relacionados à ansiedade deve-se principalmente ao fato que os níveis de exploração nas áreas aversivas dos diferentes testes comportamentais representam o modo de compreender e descrever os diversos níveis de ansiedade/emocionalidade em ratos de laboratório (Ramos e Mormède, 1998a; Prut e Belzung, 2003). Posteriormente, um estudo realizado por Ramos e colaboradores confirmou estas diferenças previamente observadas entre as linhagens e, a partir de gerações F2 derivadas de SHR e LEW, sugeriu que as diferenças observadas poderiam ter uma origem genética (Ramos et al., 1998b).

1.3. Importância do Cromossomo 4 e a descoberta do Anxrr16

Em um estudo realizado por Ramos e colaboradores (1997) a partir de seis linhagens de ratos diferentes, foram avaliados comportamentos relacionados à ansiedade em diversos testes. A partir dos resultados obtidos, Ramos e colaboradores propuseram as linhagens LEW e SHR como modelo de estudo dos comportamentos relacionados à emocionalidade. Posteriormente, utilizando uma população F2 derivada das linhagens SHR e LEW, Ramos e colaboradores (1999) realizaram um mapeamento completo do genoma e, identificaram pela primeira vez um QTL (do inglês Quantitative Trait Loci) que influencia comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade (Ramos et

al., 1999). O QTL foi mapeado no cromossomo 4 mostrando uma influência na locomoção central no teste do CA. Primeiramente chamado de Ofil1 (do inglês open field inner locomotion1), o QTL é atualmente conhecido como Anxrr16 (do inglês Anxiety related response QTL 16). Segundo o RGD (www.rgd.mcgw.edu/wg/home), o Anxrr16 é excepcionalmente forte (LOD score 7.22) e compreende uma região grande do cromossomo 4 dos ratos (aproximadamente 78 milhões de pares de bases). É importante salientar que o QTL descrito por Ramos 1999 mostrou ser de característica contra intuitiva, ou seja, animais F2 que carregavam os alelos LEW (linhagem parental com menores níveis de locomoção no centro do CA) apresentaram maior locomoção no centro do CA.

Posteriormente, um estudo reproduziu os efeitos de Anxrr16, e confirmou a importância de esta região, utilizando gerações F4 e F5 derivadas de LEW e SHR selecionados para a característica de maior ou menor locomoção, High Line and Low line, respectivamente. Eles observaram que a menor locomoção em animais Low line dependia da aversividade da situação. Este efeito estava presente tanto em machos como em fêmeas (Mormede et al., 2002). Além destes, Izídio et al. (2011) analisaram populações F2 derivadas de LEW e SHR e encontraram vários QTL tanto sugestivos como significativos dentro do locus Anxrr16. Alguns relacionados ao consumo de álcool e a diferentes comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade. Por exemplo, identificou-se novamente um QTL significativo para a locomoção no centro do CA em machos, que aparecia também em fêmeas em determinadas fases do ciclo estral (Izídio et al., 2011).

Próximo a esta região cromossômica onde se localiza o Anxrr16, outros QTL foram mapeados em estudos independentes. Um deles influenciava o consumo de etanol nas linhagens de ratos P (alcohol-preferring) e NP (alcohol-nonpreferring) (Bice et al., 1998) (Carr et al., 1998), enquanto que outro foi descrito nas linhagens HEP (high-ethanol preferring line) e Wistar-Kyoto (WKY) (Terenina-Rigaldie et al., 2003a). Além disso, estudos posteriores com as linhagens HEP e WKY sugeriram que o QTL teria um efeito pleiotrópico, atuando não somente no consumo de etanol, mas também em medidas de ansiedade, como a locomoção central no CA (Terenina-Regaldie et al., 2003b). Além destes, um estudo com as linhagens LEW e F344 encontrou um QTL no cromossomo 4 para níveis de corticosterona endógena (Potenza et al., 2004), e recentemente, Correa e colaboradores, descreveram em gerações F2 derivadas das linhagens LEW e SHR, alguns QTL no

cromossomo 4, em testes que avaliam ansiedade e memória (Correa et al., em preparação).

Este conjunto de resultados ressalta a importância desta região genômica do cromossomo 4 do rato para características relacionadas à ansiedade/emocionalidade, estresse e memória, reforçando o modelo de estudo LEW-SHR. Porém, para se chegar aos sistemas e/ou genes que regulam estes comportamentos fez-se necessário o isolamento desta área genômica em uma nova linhagem de ratos.

1.4. LINHAGENS CONGÊNICAS (SHR.LEW-ANXRR16)

Devido a que o QTL *Anxrr16* compreende uma área muito grande do cromossomo 4, a necessidade de um refinamento genético da área levou ao estabelecimento de uma estratégia de construção de linhagens congênicas derivadas das linhagens LEW e SHR (Pereira, 2010). Durante a construção de uma linhagem congênica, através de sucessivos retrocruzamentos (Fig. 1a), ocorre uma transferência de uma região genômica de interesse da linhagem doadora (LEW), para uma linhagem receptora (SHR) (Pereira, 2010). Atualmente, a linhagem congênica resultante contém a região do *locus* de interesse 100% homocigoto para alelos LEW, em um contexto genômico de 99% homocigoto SHR, e duas áreas de transferência entre o *locus* e o resto do cromossomo 4 (Fig. 1b). A nova linhagem congênica denominada SLA16 (do inglês SHR.LEW-*Anxrr16*) representa uma ferramenta única para o estudo dos genes contidos na região do cromossomo 4 que parecem ter uma forte influência, principalmente nos comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade, consumo de etanol e memória.

A linhagem SLA16 foi caracterizada e descrita como uma linhagem que contrasta com a linhagem controle SHR. Animais da linhagem SLA16 apresentam maior locomoção total no teste do CA, e menores níveis de comportamentos relacionados à ansiedade no teste do CA e do LCE (de Medeiros et al., 2013). Além disso, de acordo com resultados encontrados em nosso laboratório, a linhagem SLA16 parece não ser hipertensa e também apresenta algumas diferenças em testes de memória em relação aos SHR (Correa et al., em preparação). Estes pontos serão futuramente melhores investigados em nosso laboratório.

Alguns estudos relacionados ao sistema dopaminérgico já foram realizados em fêmeas das linhagens SHR e SLA16. Por exemplo, o tratamento com Haloperidol mostrou que ambas as linhagens respondem a este fármaco, apresentando uma diminuição na locomoção total no teste de CA. Embora os dados sejam somente preliminares, representam

os primeiros resultados realizados nestas linhagens envolvendo o sistema dopaminérgico (Gomes, 2015).

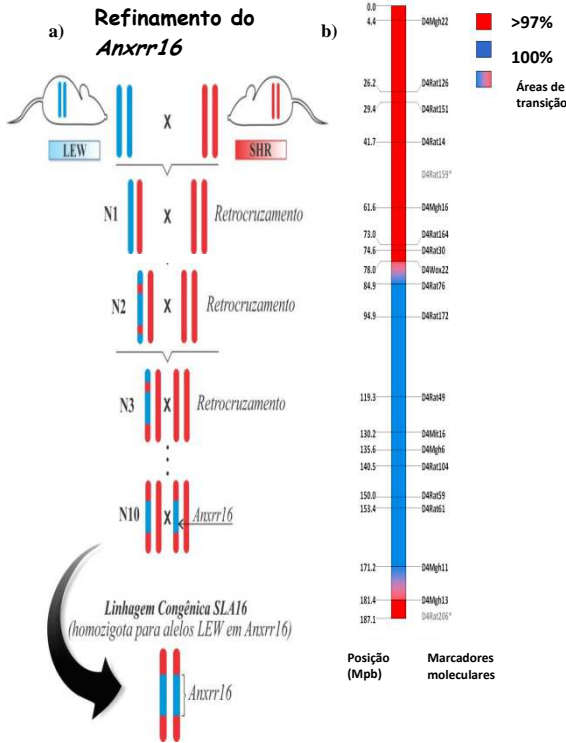


Figura 1. Representação esquemática do refinamento genético da região *Anxrr16*. Imagem adaptada de (de Medeiros et al., 2014). a) Depois de obtida a geração N1, os animais foram retrocruzados com animais SHR por 10 gerações (N10), genotipados e selecionadas para novos retrocruzamentos com a linhagem parental SHR. A linhagem congênica agora é homocigota para os alelos LEW na região de *Anxrr16* e homocigota para os alelos SHR no resto do genoma; b) representação do mapa genômico do *Anxrr16* no cromossomo 4 da linhagem congênica SLA16, com a distribuição dos marcadores moleculares na região transferida. Estão representadas as áreas derivadas da linhagem LEW em azul, o contexto genômico de SHR em vermelho e as áreas intermediárias.

1.5. SISTEMA DOPAMINÉRGICO

A dopamina (DA) é um neurotransmissor que pertence ao grupo das catecolaminas (Finlay et al., 1995). Os neurônios dopaminérgicos são um grupo de células localizadas no mesencéfalo, diencéfalo e bulbo olfatório (Bjorklund e Dunnett, 2007; Rodriguez et al., 2014; Yetnikoff et al 2014; Kim et al., 2015). No sistema nervoso central (SNC), a DA participa de quatro vias ou sistemas principais: o sistema nigroestriatal (Yee et al., 2014; Kim et al., 2015), sistema mesocortical, sistema mesolímbico (Naef et al., 2014), e sistema tubero-infundibular (Liang et al., 2014; Ribeiro et al., 2015), que se originam dos grupos celulares A9 (nigroestriatal) A10 (mesocortical e mesolímbica) e A8 (túbero-infundibular) (Dahlstroem e Fuxe, 1964; Cavalcanti et al., 2014). O sistema nigroestriatal origina-se na *Substantia Nigra pars compacta*, e estende suas fibras até o núcleo caudado *putamen*; está envolvido com movimentos voluntários (Yee et al., 2014). O sistema mesocortical conecta a área tegmental ventral (VTA) ao córtex cerebral (Wise R. A., 2004; Wise R. , 2005). O sistema mesolímbico origina-se na VTA no mesencéfalo e estende suas fibras até o *nucleus accumbens*, amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (Engel e Jerlhag, 2013). Na periferia, a DA participa da regulação hormonal, principalmente na produção de prolactina, no sistema imune (Lyons et al., 2012; Ribeiro et al., 2015), entre outros.

A síntese de DA é produzida nos neurônios dopaminérgicos a partir do aminoácido tirosina, ou fenilalanina obtida na dieta que é posteriormente convertido em tirosina. O aminoácido tirosina é convertido em um composto intermediário L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) pela ação da enzima *tirosina hidroxilase* (TH). Posteriormente, a L-DOPA é convertida no neurotransmissor DA pela atividade da enzima *dopa descarboxilase* (Beaulieu e Gainetdinov, 2011). Uma vez sintetizada, a DA é armazenada em vesículas nos neurônios dopaminérgicos que se fusionarão na membrana em resposta a uma despolarização do neurônio, resultando na liberação da DA na fenda sináptica (Moriyama e Futai, 1990). Uma vez liberada na fenda sináptica, o transportador da DA (DAT), uma proteína localizada na membrana pré-sináptica é encarregada de recaptar a DA da fenda sináptica e, duas enzimas, monoamino oxidase (MAO) localizada nos terminais pré-sinápticos e a catecol-O-metil transferase (COMT) localizada na fenda sináptica, participam da degradação da DA (Youdim et al., 2006; Hong et al., 2015). Contudo, a concentração da DA extracelular, e, portanto, sua atividade, está determinada pela recaptação

através do DAT no terminal pré-sináptico e posterior degradação pela MAO (Monoamina oxidase) e pela degradação do neurotransmissor na fenda sináptica pela COMT (Catecol-O-metiltransferase) (Gainetdinov et al., 2002).

Dentre os sistemas em que a DA participa no Sistema nervoso central (SNC), o sistema mesolímbico tem sido amplamente estudado em relação à recompensa de comida e sexo; e junto com o sistema mesocortical estão envolvidos na modulação das emoções (Wise R. A., 2004; Wise R. , 2005; Berridge e Kringelbach, 2015; Kleinridders et al., 2015). Alterações nas vias dopaminérgicas têm sido relacionadas com consumo de álcool (Ma e Zhu, 2014; Griffin et al., 2015; Ostroumov et al., 2015), abuso de drogas (Bowers et al., 2010; Sutton e Caron, 2015) e ansiedade (de la Mora et al., 2010; Zarrindast, Khakpai, 2015). Embora seja a amígdala a estrutura relacionada com os processos emocionais, existe uma crescente evidência de que o hipocampo também poderia estar envolvido, ao menos em parte, na regulação das emoções. O hipocampo tem sido estudado como a estrutura do cérebro envolvida na formação de diversos tipos de memórias. Porém, existem estudos que sugerem uma regionalização do hipocampo, na qual a área dorsal estaria relacionada com os processos de formação de memórias e aprendizado, enquanto que a região ventral é proposta como uma região mais envolvida com processos comportamentais relacionados à ansiedade (Bannerman et al., 2004; Bertoglio et al., 2006). Lyon et al., 2001 postularam que o volume do hipocampo é herdado e que poderia ser uma das causas de maior susceptibilidade ao estresse (Lyons et al., 2001). Este ponto foi apoiado por um trabalho posterior que mostrou uma correlação negativa entre o volume do hipocampo e os níveis de emocionalidade apresentados pelos animais (Kalisch et al., 2006). Por outro lado, a hiperatividade do sistema dopaminérgico no hipocampo tem sido relacionada com sintomas positivos da esquizofrenia e aumento na locomoção em resposta à anfetamina (Abi-Dargham, 2004; Kuhn et al., 2015). Embora tem sido observada que a hiperfunção do sistema dopaminérgico no hipocampo se correlaciona com comportamentos anormais em animais (Lodge e Grace, 2007; Shah e Lodge, 2013), a causa precisa dessa hiperatividade hipocampal ainda não esta bem esclarecida.

As evidências de que o hipocampo, principalmente a região ventral, participa na regulação das emoções levou a Chiavegatto e colaboradores (2009) a investigarem a possível relação entre a proteína α -sinucleína no hipocampo e as diferenças comportamentais de animais LEW e SHR na

locomoção central no CA previamente observada. O gene da α -sinucleína (Snca) se localiza na região do QTL no cromossomo 4 do rato descrito por Ramos et al. (1999) e os resultados obtidos mostraram que os animais da linhagem LEW (os mais ansiosos) tiveram maiores níveis de expressão do gene Snca e da proteína α -sinucleína, no hipocampo, quando comparados aos animais SHR. O sequenciamento deste gene permitiu descrever um SNP (do inglês polimorfismo de nucleotídeo único) entre as linhagens LEW e SHR na região 3' não transcrita. Posteriormente, através de estudos in vitro e in vivo, sugeriu-se que este SNP estava relacionado com a diferente expressão gênica da Snca nestes animais. Quando comparada a concentração de metabólito da DA, DOPAC (dihydroxyphenylacetic acid), e a taxa de DOPAC/DA no hipocampo de animais de ambas as linhagens, foi observado uma diminuição na linhagem LEW em relação à SHR. Esses dados sugerem uma menor recaptação da DA nos animais LEW (Chiavegatto et al., 2009).

A proteína α -sinucleína é muito conhecida por sua participação na doença de Parkinson, onde forma os corpos de Lewy (Arai et al., 2008; Sato et al., 2013). Também se sugere que a α -sinucleína iniba a atividade da enzima tiroxina hidroxilase (TH), que catalisa a reação limitante da síntese da dopamina (DA) nos neurônios dopaminérgicos do SNC (Sistema Nervoso Central) (Lou et al., 2010; Zhu et al., 2012; Hua et al., 2015) (Fig. 2). Assim, uma diminuição da atividade da TH resulta em uma diminuição da síntese de dopamina em neurônios pré-sinápticos dopaminérgicos, o que pode alterar a atividade do transportador da DA (DAT) afetando a recaptação da DA (Wersinger et al., 2003; Wersinger e Sidhu, 2003). Além de ter sido relacionado à doença de Parkinson, este gene foi relacionado a transtornos de ansiedade (Bannerman et al., 2004; Kalisch et al., 2006; Rothman et al., 2013).

Assim, em conjunto, estes estudos anteriores sugerem que a α -sinucleína atuando no sistema dopaminérgico poderia ter uma possível participação na regulação dos comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade nestes animais. Muito provavelmente os efeitos da α -sinucleína sejam indiretos e modulem o comportamento através dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos.

1.5.1 Receptores dopaminérgicos

Uma vez que o neurotransmissor DA é liberado na fenda sináptica, ele atua sobre cinco receptores diferentes (D1-D5), os quais estão agrupados em duas famílias. A classificação dos receptores de DA baseia-se na capacidade da DA de regular a atividade da enzima Adenil cicasse (AC). A partir dessa classificação se reconhecem os receptores da família D1, que compreende os subtipos de receptores D1 e D5; e os receptores da família D2, que compreende os receptores D2, D3, e D4. Todos os receptores de DA estão acoplados a proteínas G (Plouffe e Tiberi, 2013; Beaulieu et al., 2015). Os receptores da família D1 estão acoplados a uma família de proteínas G ativadoras (Gs). Quando a DA ativa os receptores D1 ou quando são utilizados agonistas da família D1, a proteína G acoplada ativa a enzima AC aumentando a produção de cAMP, resultando em um aumento na síntese e liberação de DA. Por outro lado, os receptores da família D2 estão acoplados a proteínas G inibitórias (Gi) que quando se liga a DA inibe a atividade da AC e, portanto, a produção de cAMP. Os receptores da família D2 regulam tanto o transporte de cálcio como a atividade dos canais de potássio, sendo as principais vias de regulação da síntese e liberação da DA (Plouffe e Tiberi, 2013; Beaulieu et al., 2015).

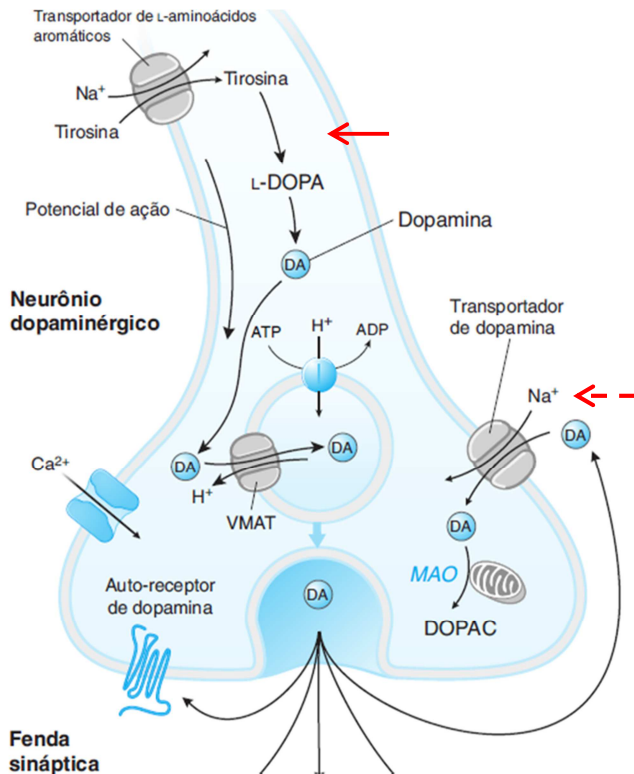


Figura 2. Neurônio dopaminérgico pré-sináptico. A proteína alfa-sinucleína inibe a atividade da tirosina hidroxilase, enzima que catalisa formação de L-DOPA a partir do aminoácido tirosina (seta cheia vermelha), e inibe a atividade do DAT (seta vermelha incompleta) diminuindo a recaptção de DA liberada na fenda sináptica (Princípios da Farmacologia 2º ed).

Estudos de caracterização dos receptores dopaminérgicos no sistema nervoso central (SNC) (Beaulieu e Gainetdinov, 2011) mostraram que as famílias de receptores D1 e D2 apresentam um padrão de distribuição similar às fibras dopaminérgicas. Os receptores do tipo D1 são mais abundantes no córtex pré-frontal, enquanto os D2 se encontram em maior quantidade no núcleo caudado, *putamen* e *nucleus accumbens* (Beaulieu e Gainetdinov, 2011; Beaulieu et al., 2015) sítios que recebem projeções dopaminérgicas (Beaulieu e Gainetdinov, 2011). Adicionalmente, os receptores da família D1 encontram-se nos terminais

pós-sinápticos de neurônios não dopaminérgicos, enquanto que os receptores da família D2 podem se encontrar nos terminais neuronais dopaminérgicos pré-sinápticos (autoreceptores) e em neurônios pós-sinápticos não dopaminérgicos (heteroreceptores) (Bello et al., 2011; Anzalone, et al., 2012). É importante salientar que o gene que codifica o receptor D2 contem seis íntrons que, como resultado do *splicing* alternativo, gera duas isoformas; a isoforma D2L (do inglês L= Long) e D2S (do inglês S = Short). Essas variantes diferem na presença de 29 aminoácidos na terceira alça citoplasmática conferindo propriedades anatômicas, farmacológicas e de sinalização particulares para cada tipo. Por exemplo, a alça diferenciada acopla-se a diferentes tipos de proteína Gi. Consequentemente, existe evidência que a isoforma D2L se localiza predominantemente nos neurônios pós-sinápticos em tanto que a isoforma D2S se encontra nos neurônios pré-sinápticos (Beaulieu e Gainetdinov, 2011; Rocchetti et al., 2015). Em um estudo com camundongos nocaute para D2L e nocaute D2L e D2S, Lindgren et al. (2003) mostraram que as isoformas D2L e D2S participam da transmissão dopaminérgica pós-sináptica e pré-sináptica, respectivamente (Lindgren et al., 2003, Rocchetti et al., 2015).

A síntese e liberação da DA é regulada pela ação dos autoreceptores localizados em neurônios dopaminérgicos (Fig. 2) através de diversos mecanismos: diminuindo a fusão das vesículas que contem DA com a membrana (Benoit-Marand et al., 2001; Phillips et al., 2002), alterando a recaptção (Truong et al., 2004; Wu et al., 2002) e regulando a atividade da enzima TH (Brodnik et al., 2013). Os autoreceptores estimulam a atividade do DAT, acelerando a recaptção de DA na fenda (Benoit-Marand et al., 2011). O uso de fármacos agonistas e antagonistas dos receptores da DA permite estudar a importância do sistema dopaminérgico nas funções que são dependentes de DA. Diversos estudos têm administrado diferentes fármacos agonistas (ex.: Quimpirole, pramipexole) e antagonistas (ex.: Haloperidol, Sulpirida) do receptor D2 na pesquisa comportamental (Paíno, 2014) como também no estudo de doenças neurológicas como Parkinson (Flores et al., 2014; Simms et al., 2015), ou psiquiátricas (Schmidt et al., 2013; Gao e Li, 2014; Talpos et al., 2015).

2. HIPÓTESE PRINCIPAL DO ESTUDO

A região genômica que diferencia as linhagens SHR e SLA16, Anxrr16, influencia na resposta do sistema dopaminérgico na locomoção do CA. Portanto, o tratamento sistêmico com fármacos que atuam no receptor D2 afetará de maneira diferente no comportamento destas linhagens. Quando o tratamento é aplicado especificamente no hipocampo ventral, os fármacos afetarão diferenciadamente na locomoção no CA dessas linhagens SHR e SLA16, nos testes comportamentais.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar a influência do receptor dopaminérgico D2 nos comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade das linhagens SHR e SLA16.

3.1. Objetivos específicos

- 1- Avaliar os comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade das linhagens SHR e SLA16 injetados sistemicamente com fármacos que atuam no receptor D2.
- 2- Avaliar os comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade das linhagens SHR e SLA16 injetados no hipocampo ventral com fármacos que atuam no receptor D2.
- 3- Quantificar o nível de expressão dos receptores D2 e DAT no hipocampo das linhagens SHR e SLA16.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

As colônias de ratos SLA16 e SHR/NCrIAnra (chamada, neste trabalho, como SHR) usadas neste estudo foram mantidas sob um sistema de acasalamento irmão/irmã, como recomendado para todas as linhagens isogênicas, no Laboratório de Genética do Comportamento (LGC-UFSC). Os animais foram desmamados e separados por sexo com quatro semanas de idade e mantidos em gaiolas de plástico coletivas (cinco ratos/gaiola). Comida e água foram oferecidas ad libitum, sob um ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acessas às 07h) com a temperatura mantida a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Os procedimentos realizados em todos os experimentos e manutenção foram segundo as orientações do Comitê de Ética em Experimentação Animal local (CEUA/UFSC, Protocolo N° PP00903).

Todos os animais utilizados nos experimentos foram machos naives entre 11-13 semanas de idade. Os animais foram pesados um dia antes de cada experimento. Após a injeção intraperitoneal ou microinjeção intrahipocampal (descritas a seguir), os animais foram isolados durante 30 ou 15 minutos, respectivamente, e, logo após, colocados no teste do CA por 5 minutos e, imediatamente após, no teste do LCE também por 5 minutos (descritos a seguir).

4.2 Testes Comportamentais

4.2.1 Campo Aberto (CA)

O aparato é feito de madeira coberta com fórmica impermeável possuindo uma área de 100 x 100 cm, com o chão branco, dividido em 25 quadrados de 20 x 20 cm (linhas divisórias pretas), 9 quadrados formam a área central e 16 a área periférica; as paredes, também brancas, possuem 40 cm de altura (Fig. 3). A luminosidade utilizada durante os experimentos foi regulada em 10 lux no centro do aparato antes de cada experimento com ajuda de um *dimmer*. Cada animal foi colocado no centro do aparato, sendo observado por 5 min. Após cada animal ser testado, o aparato foi limpo com papel toalha embebido em álcool 10%. O comportamento de cada animal foi gravado por uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato, o que permite o esclarecimento de qualquer dúvida posterior. Além disto, o monitoramento instantâneo possibilitou a retirada das medidas por um observador treinado localizado em uma sala adjacente, através de um

circuito fechado de TV. Os métodos de limpeza e gravação são os mesmos para o teste do LCE.

Os seguintes comportamentos foram registrados: número de quadrados centrais (centro do aparato; sem paredes ao lado) e periféricos (adjacentes às paredes), contabilizando aqueles quadrantes atravessados pelo animal com as quatro patas. Tempo gasto na área central e periférica. A partir destes dados foram calculadas a locomoção central (número total de quadrados andados no centro) e a locomoção periférica (número total de quadrados andados na periferia), locomoção total e porcentagem de locomoção central. A área central do aparato é considerada área mais aversiva que a região periférica. Quanto maior a locomoção e o tempo que o animal passa no centro do aparato, se considera que ele tenha um índice de menor ansiedade/emocionalidade.



Figura 3. Aparato utilizado no teste do Campo Aberto

4.2.2. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O aparato é feito de madeira coberta com uma camada de fórmica preta, apresenta quatro braços, sendo dois fechados e dois abertos, distantes 52 cm do chão (Fig. 4). Os dois braços fechados são opostos, medindo 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, com paredes de 42 cm de altura, formando uma cruz com os braços abertos, os quais também medem 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, sendo margeados por um anteparo de 0,5 cm de altura e 0,1 cm de espessura (para evitar a queda dos animais do aparato). Na interseção entre os braços fechados e abertos há uma plataforma central medindo 13,5 x 10 cm que conduz acesso a cada um dos quatro braços. Durante a

realização dos experimentos, a intensidade luminosa será de 65 lux na plataforma central, 7-9 lux nos braços abertos e 2 lux nos braços fechados. Cada rato é colocado na plataforma central de frente para um braço aberto e seu comportamento observado por 5 min. As medidas realizadas neste teste foram: número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo gasto em cada tipo de braço. Neste aparato, um maior número de entradas nos braços abertos e um maior tempo gasto neles indica uma medida de menor ansiedade/emocionalidade em animais. A medida de velocidade e distância total percorrida foi analisada pelo Software ANYMAZE.

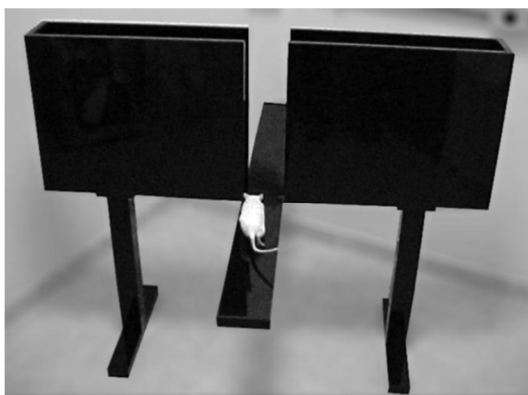


Figura 4. Aparato utilizado no teste do Labirinto em Cruz

4.3. INJEÇÕES INTRAPERITONEAIS DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2

4.3.1. Injeção intraperitoneal de Quimpirole

O Quimpirole é um agonista do receptor da dopamina D2/D3. Foi administradas, duas doses do fármaco: 1.5 mg/kg e 3 mg/kg (Giuffrida et al., 1999; Langen e Dost, 2011) e o controle Salina 0.9%, . No presente trabalho, foram testados animais machos das linhagens SHR e SLA16 (10 animais machos linhagem/tratamento). Os animais foram injetados e, logo após, isolados durante 30 minutos. Após esse tempo, foram testados por 5 minutos no CA, e seguidamente também por 5 minutos no LCE. A Quimpirole foi diluída em uma solução salina em um volume de injeção de 2 ml/kg.

4.3.2. Injeção intraperitoneal de Haloperidol

O Haloperidol é um antagonista do receptor D2 da dopamina. Foram administradas duas doses do fármaco: 0.25 mg/kg e 0.5 mg/kg (Calzavara et al., 2009) e o controle salina 0.9%. No presente trabalho foram utilizados animais machos das linhagens SLA16 e SHR (12 animais machos linhagem/tratamento). Depois de injetados, os animais foram isolados durante 30 minutos. Após esse tempo, foram testados durante 5 minutos no CA, e seguidamente colocados no LCE durante 5 minutos. O Haloperidol foi diluído em salina em um volume de injeção de 2 ml/kg.

4.4. INJEÇÕES INTRAHIPOCAMPAL DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2

4.4.1. Cirurgias estereotáxicas

Animais das linhagens SHR e SLA16 passaram por cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas bilateral (Tabela 1). Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de hidrocloreto de cetamina e Xilazina i.m. nas doses de 20 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente (Cetamin® e Xilazin® Syntec Ltda., Brasil). O animal foi colocado no aparelho estereotáxico fixando a cabeça nas barras auriculares e realizou-se a tricotomia. Foi realizada a assepsia da região com uma solução de álcool iodado (2%), e, posteriormente, foi administrada uma injeção de uma solução anestésica de lidocaína 3% (Lidostesim®, Dentsply Pharmaceutical, Brasil) por via subcutânea (s.c.). Um parafuso de aço inoxidável foi fixado ao crânio após perfuração com uma broca odontológica.

Tratamento	Doses	Nº de animais SHR	Nº de Animais SLA16	Ação
Controle	Salina 0.9%	8	8	
Quimpirole HCl	8 µg/µL;	8	8	Agonista D2
Quimpirole HCl	16 µg/ µL	8	8	
Controle	Salina 0.9%	7	7	
Haloperidol	1 µg/µL	7	7	Antagonista D2
Haloperidol	2 µg/µL	7	7	

Tabela 1. Nº total de animais das linhagens SHR e SLA16 que passaram pela cirurgia estereotáxica para implantação das cânulas bilaterais.

Para obtenção das coordenadas referentes ao hipocampo de ratos foi utilizado o atlas do cérebro de Paxinos e Watson (2005) sendo as medidas antero-posterior = -5-3 mm; latero-lateral = +5mm; dorso-ventral= -5 mm. Duas cânulas-guia, confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (22 G1; 25,0 x 7,0 mm) ajustadas para um comprimento de 12,0 mm, foram implantadas bilateralmente, permanecendo no hipocampo. Após a colocação das cânulas-guia, a área recebeu uma camada de acrílico odontológico para integrar e ancorar todas as peças ao crânio. Em cada uma das cânulas foi inserido um fio de aço inoxidável (nº 30) a fim de evitar uma possível obstrução. Após o procedimento, cada animal recebeu uma injeção intramuscular (0,1 ml) profilática de antibiótico (pentabiótico veterinário Benzilpenicilina benzatina (Penicilina G Benzatina®, Ariston) 120000 UI em 0,2 ml) via intramuscular (i.m.), seguido da injeção do anti-inflamatório e analgésico diclofenaco (voltaren®, Novartis). Em seguida, foram levados ao biotério e colocados em gaiolas onde permaneceram em observação nas primeiras horas após a cirurgia. A recuperação dos animais foi de 7 a 14 dias até a realização dos experimentos.

4.4.2. Microinjeções intrahipocampais

As microinjeções dos tratamentos com antagonista e agonista do receptor D2 foram realizadas bilateralmente no hipocampo utilizando agulhas (30 G curta) conectadas a um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro) adaptado a uma microseringa (Hamilton, EUA). A microinjeção foi realizada com uma bomba (Insight, Brasil) com um fluxo de 0.40 $\mu\text{L}/\text{min}$. O animal foi manualmente imobilizado e o fio de aço retirado com ajuda de um alicate para desobstruir a cânula-guia. Cada animal recebeu um volume de 0.5 μL dos tratamentos por hemisfério hipocampal. Após a injeção, as agulhas foram mantidas por 60 segundos a fim de evitar o refluxo da solução.

4.4.2.1. Microinjeção intrahipocampal de Quimpirole

As doses administradas do agonista D2, Quimpirole, foram 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Wilkerson e Levin, 1999; Shamsizadeh et al., 2013) e o controle salina 0.9%.

4.4.2.2. Microinjeção intrahipocampal de Haloperidol

As doses administradas do antagonista D2, Haloperidol, foram 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Muthuraju et al., 2014), e o controle salina 0.9%.

4.4.3. Análises histológicas

Após os animais terem sido microinjetados e passado pelos testes comportamentais do CA e LCE, eles receberam uma injeção de solução anestésica contendo cloral hidratado (30% p/v; 3 ml/animal; Vetec, Brasil) via IP. Após serem decapitados, os encéfalos foram retirados e conservados individualmente em solução de formalina 10%. Os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose 20% por, no mínimo, 72 h antes da realização dos cortes histológicos. A fim de verificar o local de injeção da droga, cortes de 40 μm foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Alemanha) a uma temperatura aproximada de $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro previamente gelatinizadas. A localização da cânula e a microinjeção foi observada e verificada com a utilização de uma lupa. Apenas os animais que apresentaram uma localização central ou periférica da injeção bilateral, na região ventral do hipocampo foram incluídos nas análises estatísticas (Fig. 5).

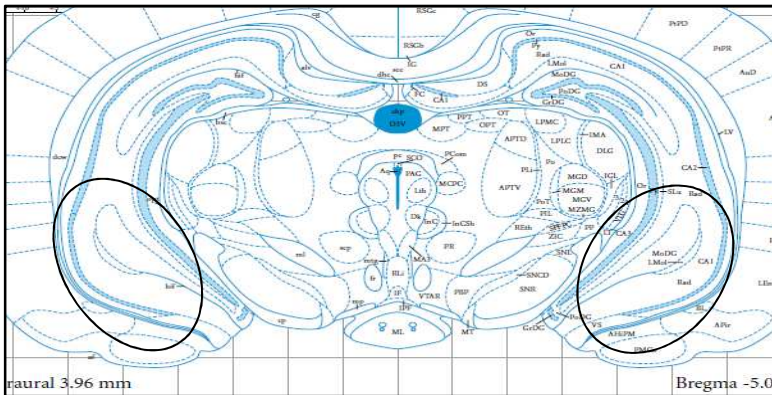


Figura 5. Análises histológicas da posição das cânulas. Imagem adaptada do The Rat Brain. In stereotaxic coordinates. Paxinos e Watson, 2005. As elipses negras representam a área das injeções em ambos os hemisférios.

As cirurgias tiveram aproximadamente 80% de acertos. Os números de animais que efetivamente foram utilizados nas análises estatísticas estão resumidos na Tabela 2.

Tratamento	Doses	Nº de animais SHR	Nº de animais SLA	Ação
Controle	Salina 0.9%	5	7	
Quimpirole HCl	8 µg/µL	8	6	Agonista D2
Quimpirole HCl	16 µg/ µL	6	8	
Controle	Salina 0.9%	6	5	
Haloperidol	1 µg/µL	5	6	Antagonista D2
Haloperidol	2 µg/µL	6	5	

Tabela 2. Animais utilizados para cálculo das variáveis depois da análise histológica de localização das cânulas no hipocampo de animais das linhagens SHR e SLA16

4.5. WESTERN BLOT

Animais *naïve* foram utilizados para a quantificação dos receptores D2 e DAT no hipocampo de animais das linhagens SHR (n=5) e SLA16 (n=5). Os animais com 11 semanas de idade foram primeiramente levados a uma câmara de sedação e posteriormente foram decapitados com guilhotina. O hipocampo dos animais foi dissecado a fresco e as amostras foram mantidas em freezer -80°C até o momento da extração celular. Os tecidos, mantidos em gelo, foram macerados com 200 µl de tampão de lise (RIPA), ao qual foi adicionado o inibidor de proteases (1%, Sigma, St. Louis, MO, EUA). O lisato foi centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi utilizado nos experimentos. A quantificação das proteínas total em cada amostra foi realizada utilizando o protocolo Protein A280 do aparelho Nanodrop® (Thermo Fischer Scientific,

EUA). Alíquotas contendo de 30 µg de proteínas foram carregadas e submetidas à eletroforese em gel dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% e transferido para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Posteriormente, as membranas foram bloqueada com uma solução de BSA 10% preparada em solução TBS-Tween 0,01% durante 1h, sob agitação a 4°C. Em seguida, foram expostas aos anticorpos primários contra as proteínas DAT (Santa Cruz Biotechnology, sc-1433, 1:1000) e D2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-5303, 1:1000). A exposição aos anticorpos primários foi realizada overnight a 4°C, sob agitação constante. Após, as membranas foram lavadas em solução TBS-Tween durante 30 min e incubadas com anticorpos secundários (anti-cabra ou anti-camundongo, 1:25000) conjugados a peroxidase, por pelo menos 2h à temperatura ambiente. A reatividade foi detectada com o uso de potencializadores de quimioluminescência autorradiográfica (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA) e reveladas em revelador automático Chemidoc (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA). As bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o programa ImageJ (NIH, EUA) e normalizadas em relação à β-actina (Santa Cruz Biotechnology, sc-81178, 1:1000).

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados dos testes comportamentais foram analisados através de ANOVA fatorial (*duas vias*). Quando necessário, foi realizado o teste de comparação de médias (*post-hoc*) *Newman-Keuls*. As médias calculadas a partir dos dados obtidos da quantificação dos receptores D2 e DAT no hipocampo de animais das linhagens SHR e SLA16 foram comparadas através do teste-t de Student. As análises estatísticas foram realizadas com a ajuda do programa Statistica7® e os resultados obtidos foram expressos em gráficos realizados com o programa GraphPad5®. Valores de p menores ou igual a 0,05 foram considerados resultados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

Nesta seção de resultados serão utilizados os seguintes símbolos nos gráficos:

* = Diferença entre as linhagens, segundo ANOVA de duas vias.

+ = Efeito de tratamento, segundo ANOVA de duas vias.

& = Interação seguida de diferença entre linhagens, segundo *post-hoc Newman Keuls*.

= Interação seguida de efeito de tratamento, segundo *post-hoc Newman Keuls*.

A quantidade de símbolos utilizados em cada caso expressa o valor de p. Exemplo: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$; *** = $p < 0.001$.

5.1.0 Injeção intraperitoneal e Intrahipocampal de agonista D2: Quimpirole

5.1.1. Quimpirole intraperitoneal-CA

A ANOVA de duas vias mostrou uma interação significativa na locomoção central (nº de quadrantes cruzados com as quatro patas na área central do CA) para os fatores linhagem e tratamento [$F_{(2, 54)} = 3,0483$, $p = 0.05$]. O teste *post-hoc Newman Keuls*, revelou que as linhagens SHR e SLA16 diferem somente no grupo controle (Fig. 6a). Também ocorreu uma interação significativa na locomoção periférica (nº de quadrantes cruzados com as quatro patas na área periférica do CA) para os fatores linhagem e tratamento [$F_{(2, 54)} = 5,8200$, $p < 0.05$]. O teste *post-hoc Newman Keuls*, mostrou que as linhagens SHR e SLA16 diferem somente no grupo controle. O fator tratamento também apresenta diferença significativa [$F_{(2, 54)} = 60,633$, $p > 0.001$]. A locomoção periférica dos grupos tratados com Quimpirole é menor quando comparado com o grupo controle correspondente (Fig. 6b).

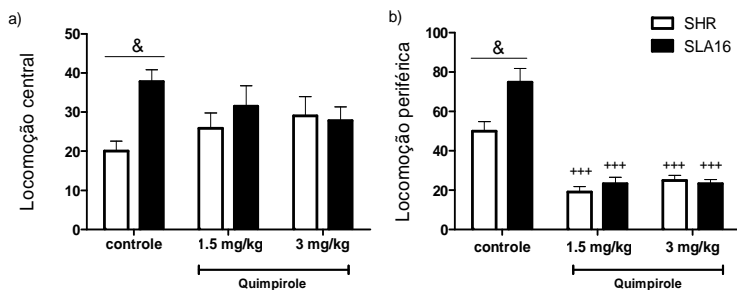


Figura 6. Locomoção central e periférica no CA após administração IP de Quimpirole. a) O *post-hoc* revelou uma diferença entre os grupos controle das linhagens SHR e SLA16 (& = $p < 0.05$). b) A ANOVA mostrou que os grupos tratados com Quimpirole se locomovem menos na periferia que os grupos controle correspondente de cada linhagem (+++ = $p < 0.001$). O *post-hoc* revelou uma diferença entre os grupos controle das linhagens SHR e SLA16 (& = $p < 0.05$).

Na locomoção total (nº de quadrantes total cruzados com as quatro patas no CA), a análise de ANOVA de duas vias mostrou uma interação entre linhagem e tratamento [$F_{(2, 54)} = 7,1783$, $p < 0,005$]. O teste *post-hoc Newman Keuls* mostrou que somente na linhagem SLA16 os grupos tratados com Quimpirole apresentam menor locomoção total quando comparado com o grupo controle, sugerindo um efeito farmacogenético. O *post-hoc* também revelou que os grupos controle apresentam diferença significativa, sendo a linhagem SLA16 a que apresenta maior locomoção total (Fig. 7a). Na porcentagem de locomoção central se observou diferença significativa para o efeito tratamento [$F_{(2, 54)} = 29,176$, $p < 0.001$]. O teste *post-hoc Newman Keuls* revelou um efeito que os grupos tratados com Quimpirole apresentam maior porcentagem de locomoção central no CA quando comparados com seus grupos controle correspondente. (Fig. 7b).

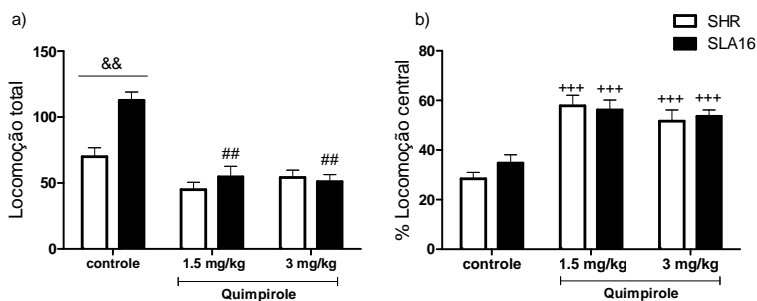


Figura 7. Locomoção total e porcentagem de locomoção central do CA após administração IP de Quimpirole. a) O *post-hoc* revelou que na linhagem SLA16, o grupo controle apresenta maior locomoção total do que os grupos tratados com Quimpirole (## = $p < 0.005$). Observa-se também uma diferença significativa na locomoção total nos grupos controle, onde animais da linhagem SLA16 apresentam maiores níveis de locomoção total que animais da linhagem SHR (&& = $p < 0.005$), b) A ANOVA mostrou efeito do tratamento em ambas as linhagens. Os grupos controle apresentam menores % da locomoção central que os grupos tratados com Quimpirole (+++ = $p < 0.001$).

Para o tempo gasto na área central do CA, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito para o fator tratamento [$F(2, 54) = 23,175, p < 0.001$]. O teste *post-hoc* Newman Keuls, mostrou que ambos os grupos tratados com Quimpirole passam mais tempo no centro do CA quando comparados com o grupo controle (Fig. 8a). Também foi observada uma diferença significativa no tempo gasto na periferia do CA para o fator tratamento [$F(2, 54) = 23,181, p < 0.001$]. O teste *post-hoc* Newman Keuls mostrou que ambos os grupos tratados com Quimpirole gastam menos tempo na periferia do CA quando comparado com os grupos controle (Fig. 8b).

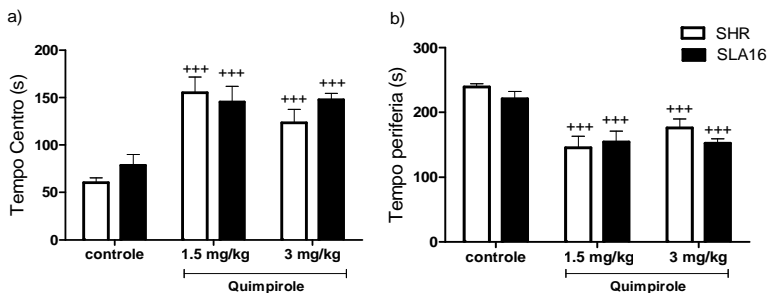


Figura 8. Tempo gasto no centro e na periferia do CA após administração IP de Quimpirole. a) A ANOVA mostrou um efeito de tratamento na locomoção central. Os grupos controle gastam menos tempo no centro do CA quando comparado aos grupos tratados com Quimpirole (+++ = $p < 0.001$), b) A ANOVA mostrou um efeito de tratamento na locomoção periférica. Os grupos tratados com Quimpirole passam menos tempo na periferia quando comparados com os controles (+++ = $p < 0.001$).

5.1.2. Quimpirole intraperitoneal - LCE

No número de entrada nos braços abertos, a análise de ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa para o fator linhagem [$F_{(1, 54)} = 9,1407$, $p < 0.05$]. Observou-se que os animais da linhagem SLA16 apresentam um maior número de entradas nos braços abertos em todos os tratamentos quando comparado com animais da linhagem SHR (Fig. 9a). Também existe um efeito geral do tratamento para variável número de entradas nos braços fechados [$F_{(2, 54)} = 26,189$, $p < 0.0001$]. O teste *post-hoc Newman Keuls* revelou que os grupos tratados com Quimpirole mostraram um menor número de entradas nos braços fechados quando comparado com seu controle correspondente (Fig. 9b).

Para o tempo gasto nos braços abertos, a análise de ANOVA de duas vias mostrou uma diferença significativa para o fator linhagem [$F_{(1, 54)} = 4,3624$, $p < 0.05$], onde animais SLA16 gastam mais tempo nos braços abertos, quando comparados com a linhagem SHR. Por outro lado, a ANOVA também revelou diferenças significativas para o fator tratamento [$F_{(2, 54)} = 20,207$, $p < 0.0001$]. O teste *post-hoc Newman Keuls* mostrou que os grupos tratados com Quimpirole passam mais tempo nos braços abertos que os grupos controle (Fig. 10a). No tempo gasto nos braços fechados, ocorreu uma interação entre linhagem e tratamento [$F_{(2, 54)} = 3,2385$, $p < 0.05$]. O teste *post-hoc Newman Keuls* revelou que na linhagem SHR os grupos que receberam o tratamento com Quimpirole mostraram menor tempo gasto nos braços fechados quando

comparados com o controle. Também mostrou que nos grupos que receberam a dose maior de Quimpirole (3 mg/kg), o grupo da linhagem SHR gastou mais tempo nos braços fechados que o grupo da mesma dose da linhagem SLA16, sugerindo um efeito farmacogenético. (Fig. 10b).

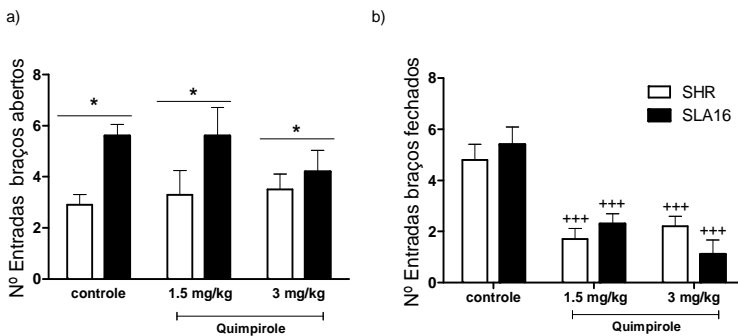


Figura 9. Número de entradas nos braços abertos e fechados do LCE após administração IP de Quimpirole. a) A ANOVA mostrou uma diferença significativa para o fator linhagem onde animais da linhagem SLA16 apresentam um maior número de entradas nos braços abertos em relação à linhagem SHR (* = $p < 0.05$), b) A ANOVA mostrou efeito do tratamento. Os grupos controle apresentam um maior número de entradas nos braços fechados que os grupos tratados com duas doses de Quimpirole (+++ = $p < 0.001$).

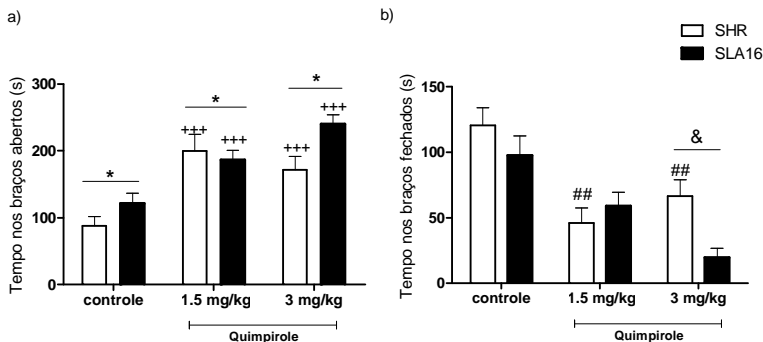


Figura 10. Tempo gasto nos braços abertos e fechados do LCE após administração IP de Quimpireole. a) A ANOVA mostrou que a linhagem SHR gasta menos tempo nos braços abertos do que a linhagem SLA16 (*= $p < 0.05$). Os grupos tratados com Quimpireole gastam mais tempo nos braços abertos que seu o controle correspondente (+++ = $p < 0.001$), b) O post-hoc mostrou que na linhagem SHR os grupos tratados com Quimpireole gastam menos tempo nos braços fechados que o controle (## = $p < 0.005$). Post-hoc mostrou que o grupo SHR tratado com maior dose de Quimpireole (3mg/kg) gasta mais tempo nos braços fechados que o grupo da linhagem SLA16 com a mesma dose de Quimpireole (&= $p < 0.05$)

5.1.3. Quimpireole Intrahipocampal- CA

Na locomoção central, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do fator tratamento [$F_{(2, 34)} = 21,069$, $p < 0.001$]. O teste *post-hoc* revelou que os grupos tratados apresentaram menor locomoção central quando comparado com o grupo controle (Fig. 11a). Por outro lado, a análise ANOVA de duas vias também mostrou um efeito do fator tratamento na locomoção periférica do CA [$F_{(2, 34)} = 17,151$, $p < 0.001$]. O teste *post-hoc* revelou que os grupos tratados se locomoveram menos na área periférica do CA que o grupo controle (Fig. 11b).

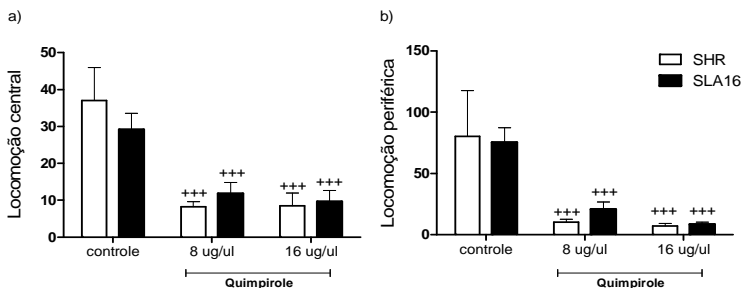


Figura 11. Locomoção central e periférica no CA após administração Intrahipocampal de Quimpirole. a) A ANOVA revelou efeito do tratamento. Os grupos controle se locomovem mais na área central do CA do que os grupos tratados com Quimpirole (+++ = $p < 0.001$), b) A ANOVA revelou efeito do tratamento. Os grupos controle se locomovem mais na área periférica do que os grupos tratados com Quimpirole (+++ = $p < 0.001$).

Na locomoção total, a análise ANOVA de duas vias mostrou um efeito do fator tratamento [$F_{(2, 34)} = 19,561$, $p < 0,001$]. O teste *post-hoc* revelou que os grupos controle apresentaram uma locomoção total maior que a locomoção dos grupos injetados com Quimpirole. (Fig. 12a). Na porcentagem de locomoção central, a ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significativas (Fig. 12b).

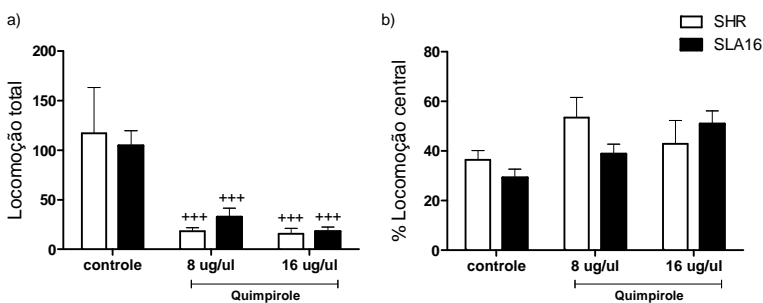


Figura 12. Locomoção total e porcentagem da locomoção central no CA após administração Intrahipocampal de Quimpirole. a) A ANOVA revelou efeito do tratamento. Os grupos controle apresentaram maior locomoção total que os grupos injetados com Quimpirole no hipocampo ventral (+++ = $p < 0.001$). b) A ANOVA não revelou diferenças significativas na medida de porcentagem de locomoção central.

No tempo gasto no centro do CA, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito do fator tratamento [$F_{(2, 34)} = 10,042$, $p < 0,05$]. O teste *post-hoc* revelou que os grupos que receberam injeção da dose maior do Quimpirole (16 ug/ul) passaram mais tempo no centro do CA que o grupo controle e o grupo que recebeu a menor dose de Quimpirole (8 ug/ul) (Fig. 13a). No tempo gasto na periferia do CA, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito do fator tratamento [$F_{(2, 34)} = 6,7683$, $p < 0,05$]. O teste *post-hoc* revelou que os grupos injetados com a maior dose de Quimpirole (16 ug/ul) passaram menos tempo na área periférica do CA que o grupo controle e o grupo tratado com a menor dose de Quimpirole (8 ug/ul) (Fig. 13b).

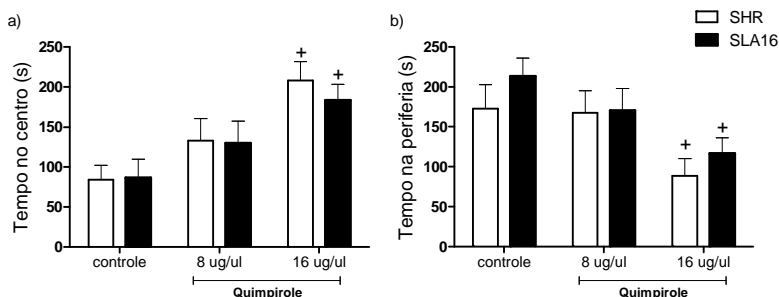


Figura 13. Tempo gasto no centro e na periferia do CA após administração Intrahipocampal de Quimpirole. a) A ANOVA revelou que os grupos que receberam a dose maior de Quimpirole (16 ug/ul) no hipocampo ventral permaneceram mais tempo no centro do CA que os grupos controle e os grupos tratados com 8 ug/ul de Quimpirole (+ = $p < 0,05$). b) A ANOVA revelou que os grupos tratados com (16 ug/ul) de Quimpirole no hipocampo ventral passaram menos tempo na periferia que os grupos controle e os grupos tratados com 8 ug/ul de Quimpirole (+ = $p < 0,05$).

5.1.4. Quimpirole Intrahipocampal-LCE

A análise ANOVA de duas vias para o número de entradas nos braços abertos do LCE mostrou uma diferença para o fator linhagem [$F_{(2, 34)} = 10,333$, $p < 0,005$]. Os animais da linhagem SLA16 apresentam um maior número de entradas nos braços abertos que os animais da linhagem SHR. Também foi observado um efeito significativo do tratamento [$F_{(2, 34)} = 6,8015$, $p < 0,001$]. O teste *post-hoc* revelou que os grupos controle apresentaram um maior número de entradas nos braços abertos que os grupos tratados com Quimpirole (Fig. 14a). Para o número de entradas nos braços fechados, a ANOVA mostrou um efeito

do tratamento [$F_{(2, 34)} = 15,390$, $p < 0,001$]. O teste *post-hoc* revelou que os grupos controle apresentam um maior número de entradas nos braços fechados que os grupos com Quimpirole (Fig. 14b).

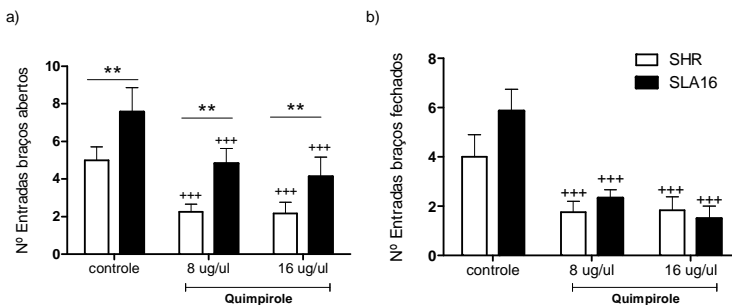


Figura 14. Número de entradas nos braços abertos e fechados no LCE após administração Intrahipocampal de Quimpirole. a) A ANOVA mostrou que a linhagem SLA16 entra mais vezes nos braços abertos que a linhagem SHR (**= $p < 0,005$). A ANOVA mostrou efeito do tratamento. Os grupos controle apresentam um menor número de entradas nos braços abertos em relação aos grupos tratados com Quimpirole (+++ = $p < 0,001$). b) A ANOVA mostrou efeito tratamento. Os grupos controle apresentaram um maior número de entradas nos braços fechados (+++ = $p < 0,001$).

No tempo gasto nos braços abertos e fechados, a análise ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significativas (Fig. 15 a-b).

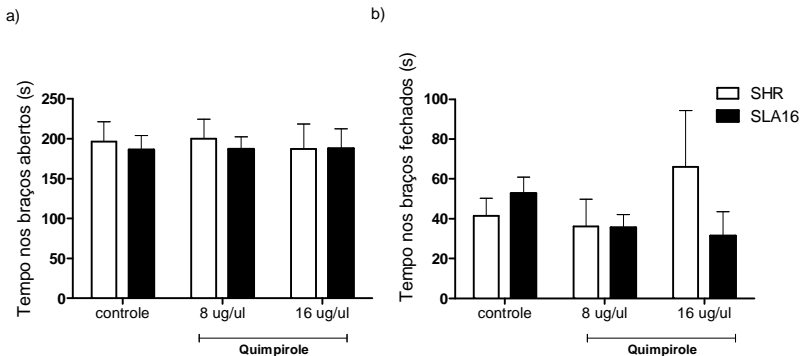


Figura 15. Tempo gasto nos braços abertos e nos braços fechados no LCE após administração Intrahipocampal de Quimpirole. a) A ANOVA não mostrou diferenças para o tempo gasto nos braços abertos do LCE entre os grupos. b) A ANOVA não mostrou diferenças significativas no tempo gasto nos braços fechados do LCE entre os grupos.

Como forma de resumo gráfico, a tabela 2 mostra algumas das medidas avaliadas nas duas linhagens SHR e SLA16, tanto no tratamento IP como Intrahipocampal com o agonista D2 Quimpirole, nos testes comportamentais CA e LCE. O traço indica que não houve modificações nas medidas avaliadas, em tanto que as setas indicam aumento ou diminuição das medidas quando elas aparecem para acima ou para abaixo, respectivamente, após a administração IP ou intrahipocampal de Quimpirole.

QUIMPIROLE									
		Intraperitoneal				Intrahipocampal			
	Linhagem	SHR		SLA16		SHR		SLA16	
	Dose	1,5 mg/kg	3 mg/kg	1,5 mg/kg	3 mg/kg	8µg/µL	16µg/µL	8µg/µL	16µg/µL
CA	Loc. Ctral.	—		—		↓		↓	
	Loc. Perif.	↓		↓		↓		↓	
	Loc Total	—		↓		↓		↓	
	% Loc ctral.	↑		↑		—		—	
LCE	EBA	—		—		↓		↓	
	EBF	↓		↓		↓		↓	
	TBA	↑		↑		—		—	
	TBF	↓		↓		—		—	

Tabela 3. Resumo gráfico do tratamento IP e Intrahipocampal com Quimpirole nas linhagens SHR e SLA16. Resultados obtidos das medidas avaliadas para CA e para LCE. (traço indica que não houve mudança; seta para baixo indica diminuição; seta para acima indica aumento).

5.2.0. Injeção Intraperitoneal e Intrahipocampal de antagonista D2: Haloperidol

5.2.1. Haloperidol intraperitoneal-CA

A análise de ANOVA de duas vias para a variável locomoção central do CA mostrou uma interação entre linhagens e tratamento [$F_{(2, 64)} = 3,6229$, $p < 0.05$]. O teste *post-hoc Newman Keuls* revelou que somente o grupo de animais da linhagem SLA16 tratado com a maior dose de Haloperidol (0.5 mg/kg) se locomove significativamente menos que os outros grupos (Fig. 16a). Para a locomoção periférica também ocorreu uma interação entre linhagens e tratamento [$F_{(2, 64)} = 3,8167$, $p < 0.05$]. Da mesma maneira, o teste *post-hoc Newman Keuls* revelou que somente o grupo de animais da linhagem SLA16 tratado com maior dose de Haloperidol (0.5 mg/kg) se locomove menos na região periférica que os outros grupos (Fig. 16b).

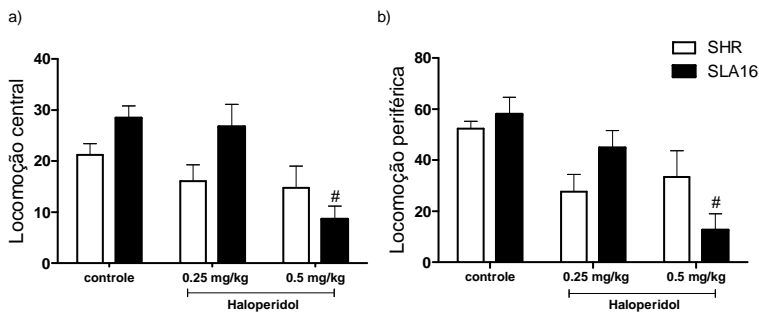


Figura 16. Locomoção central e periférica do CA após administração IP de Haloperidol. a) O *post-hoc* revelou que somente o grupo SLA16 tratado com a dose maior de Haloperidol apresenta menor locomoção central que os outros grupos ($\# = p < 0.05$). b) o *post-hoc* mostrou que somente o grupo SLA16 tratado com a maior dose de Haloperidol (0.5 mg/kg) apresenta uma menor locomoção periférica quando comparado com os outros grupos ($\# = p < 0.05$)

Na locomoção total, a análise de ANOVA de duas vias revelou uma interação entre linhagem e tratamento [$F_{(2, 64)} = 4,5116, p < 0.05$]. O teste *post-hoc* mostrou somente o grupo da linhagem SLA16 que recebeu a maior dose de Haloperidol 0.5 mg/kg apresentou menores níveis de locomoção quando comparado com os grupos que receberam a menor dose de Haloperidol e o controle (Fig. 17a). Por outro lado, para a porcentagem da locomoção central a ANOVA revelou uma interação entre linhagens e tratamento [$F_{(2, 64)} = 3,1860, p < 0.05$]. O teste *post-hoc* mostrou que somente a dose de Haloperidol (0.25 mg/kg) foi efetiva em aumentar a porcentagem de locomoção central nos animais SHR, sugerindo um efeito farmacogenético (Fig. 17b).

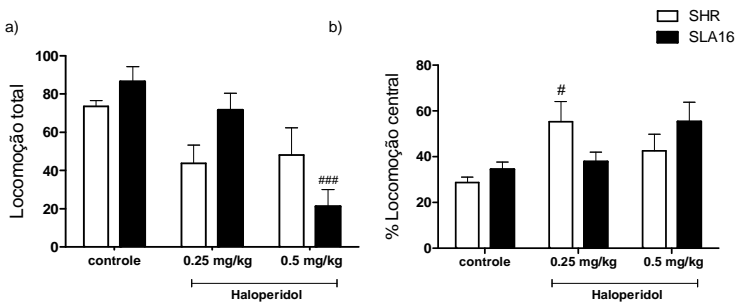


Figura 17. Locomoção total e porcentagem da locomoção central no CA após administração IP de Haloperidol. a) O *post-hoc* mostrou que na linhagem SLA16, somente o grupo tratado com 0.5 mg/kg de Haloperidol apresentou menor locomoção (### = $p < 0,001$). b) O *post-hoc* mostrou que o grupo SHR que recebeu a dose (0.25 mg/kg) de Haloperidol apresentou maior porcentagem da locomoção central (# = $p < 0,05$).

Para o tempo no centro do CA, a análise de ANOVA de duas vias mostrou uma interação entre linhagem e tratamento [$F(2, 64) = 6,5909$, $p < 0,005$]. O teste *post-hoc Newman Keuls* revelou que na linhagem SLA16, só o grupo tratado com a maior dose de Haloperidol gastou mais tempo no centro do aparato quando comparado com os outros grupos. Também foi observado, que na linhagem SHR, somente o grupo que recebeu a menor dose (0.25mg/kg) apresenta diferença significativa em relação ao controle, sugerindo um efeito farmacogenético (Fig. 18a). No tempo na periferia, a ANOVA de duas vias mostrou uma interação entre linhagem e tratamento [$F(2, 64) = 6,4538$, $p < 0,005$]. O teste *post-hoc Newman Keuls* revelou que na linhagem SHR, o tratamento foi efetivo em reduzir o tempo na periferia somente no grupo que recebeu a menor dose (0.25 mg/kg), enquanto que na linhagem SLA16 foi somente no grupo tratado com a maior dose de Haloperidol (0.5 mg/kg) (Fig. 18b).

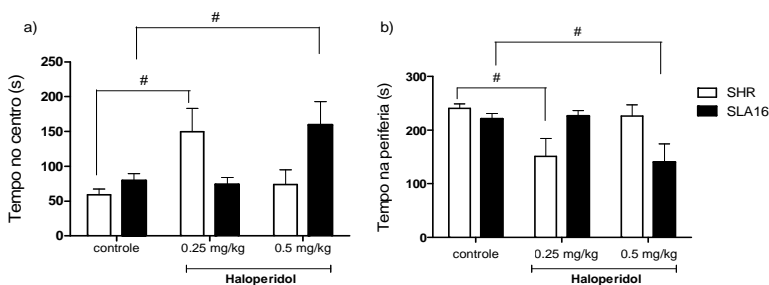


Figura 18. Tempo gasto no centro e na periferia do CA após administração IP de Haloperidol. a) O *post-hoc* revelou que o grupo da linhagem SLA16 tratado com 0.5 mg/kg de Haloperidol passou significativamente mais tempo no centro do CA quando comparado com grupo controle (# = $p < 0.05$). O grupo SHR que recebeu 0.25 mg/kg passou mais tempo em relação ao controle (# = $p < 0.05$). b) O *post-hoc* revelou que o grupo da linhagem SLA16 tratado com 0.5 mg/kg de Haloperidol passou significativamente menos tempo na periferia do CA quando comparado com grupo controle (# = $p < 0.05$). O grupo SHR que recebeu 0.25 mg/kg passou menos tempo em relação ao controle (# = $p < 0.05$).

5.2.2. Haloperidol intraperitoneal-LCE

A análise de ANOVA de duas vias para a variável número de entradas nos braços abertos do LCE mostrou um efeito significativo para o fator tratamento [$F_{(2, 64)} = 6,6353$, $p < 0,05$]. O teste *post-hoc Newman Keuls* revelou que os grupos tratados com Haloperidol apresentaram menor número de entradas nos braços abertos que o grupo controle (Fig. 19a). Para o número de entradas nos braços fechados, a ANOVA mostrou uma diferença significativa no fator tratamento [$F_{(2, 64)} = 13,170$, $p < 0,001$]. O teste *post-hoc Newman Keuls* revelou que os grupos tratados com Haloperidol diminuem o número de entradas nos braços fechados em relação ao controle correspondente (Fig. 19b).

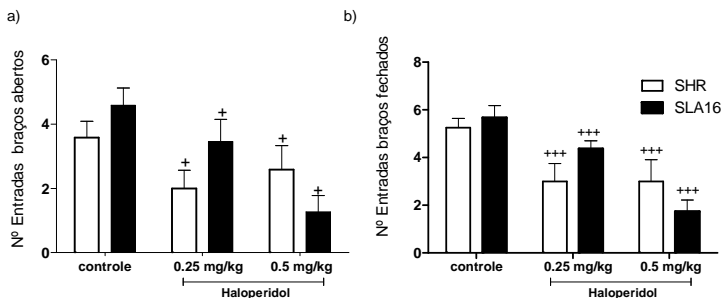


Figura 19. Número de entradas nos braços abertos e fechados do LCE após administração IP de Haloperidol. a) A ANOVA revelou efeito do tratamento. Os grupos tratados com Haloperidol entram menos vezes nos braços abertos que o controle (+ = $p < 0.05$), b) A ANOVA revelou um efeito do tratamento. Os grupos tratados com Haloperidol entram menos vezes nos braços fechados em relação aos grupos controle (+++ = $p < 0.001$).

A análise de ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significativas nas variáveis: Tempo gasto nos braços abertos (Fig. 20a) ou nos braços fechados do LCE (Fig. 20b). Com o intuito de avaliar o possível efeito sedativo do tratamento IP com Haloperidol, foi medida a velocidade e a distância percorrida pelos animais das linhagens SHR e SLA16 no LCE com ajuda do Software ANYMAZE. A análise de ANOVA de duas vias dos resultados obtidos não revelou diferenças significativas na velocidade na locomoção dos animais (Fig. 20c). A medida da distância percorrida pelos animais não apresentou diferenças significativas entre linhagens ou no fator tratamento (Fig. 20d).

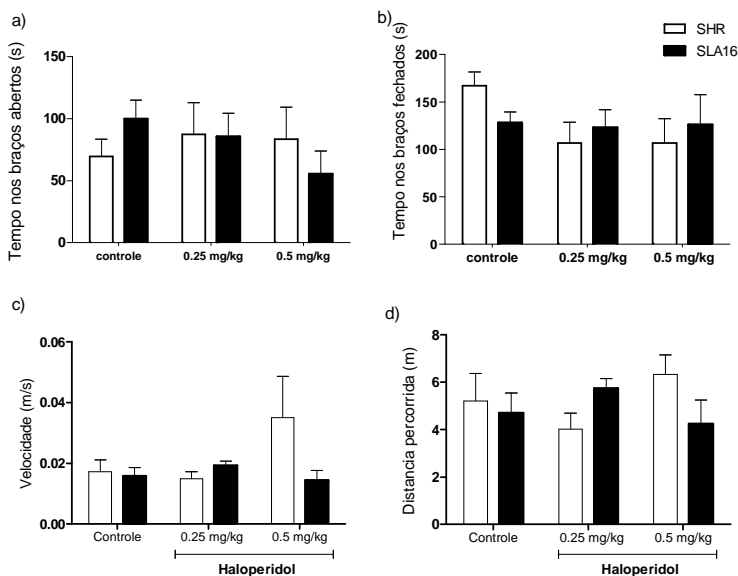


Figura 20. Tempo gasto nos braços abertos e fechados, distância percorrida e velocidade no teste LCE após administração IP de Haloperidol. a) A ANOVA não revelou diferenças significativas no número de entradas nos braços abertos entre o grupo controle e os tratados das linhagens SHR e SLA16. b) A ANOVA não revelou diferenças significativas no número de entradas nos braços fechados entre o grupo controle e os grupos tratados das linhagens SHR e SLA16. c) A ANOVA não revelou diferenças significativas na velocidade dos animais tratados com Haloperidol ou controle. d) A ANOVA não revelou diferenças significativas na distância percorrida entre animais das linhagens SHR e SLA16.

5.2.3. Haloperidol Intrahipocampal- CA

A análise de ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas entre as linhagens tanto para locomoção central [$F(2, 34) = 10,897, p < 0,005$] como para locomoção periférica [$F(2, 34) = 5,4642, p < 0,05$]. Os animais da linhagem SLA16 se locomoveram mais no centro e na periferia do CA que animais SHR (Fig. 21a-b).

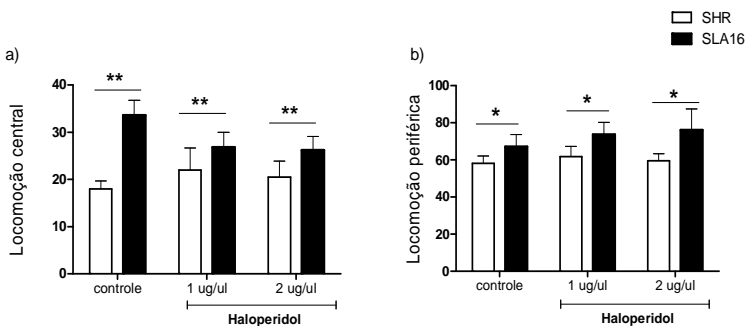


Figura 21. Locomoção central e periférica no CA após administração Intrahipocampal de Haloperidol. a) A ANOVA mostrou que a linhagem SLA16 se locomove mais na área central do CA que a linhagem SHR (**= $p < 0.005$). b) A ANOVA mostrou que a linhagem SLA16 apresentaram maiores níveis de locomoção periférica quando comparados com animais SHR (*= $p < 0.05$).

A ANOVA de duas vias mostrou que a linhagem SLA16 apresenta maior locomoção total no CA que a linhagem SHR [$F_{(2, 34)} = 12,356$, $p < 0,005$] (Fig. 22a). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para porcentagem de locomoção central no CA (Fig. 22b).

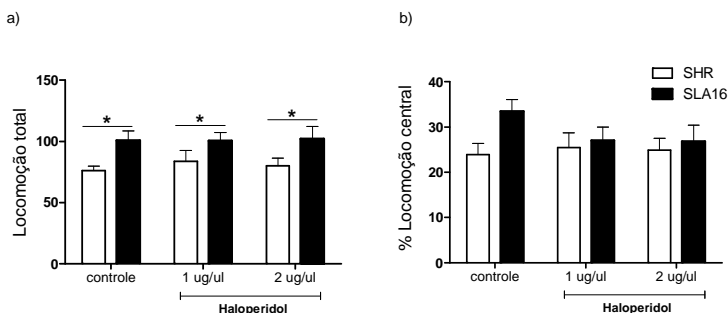


Figura 22. Locomoção total e porcentagem da locomoção central no CA após administração Intrahipocampal de Haloperidol. a) A ANOVA revelou que animais SLA16 apresentam maior locomoção total comparado que animais SHR no CA (*= $p < 0.05$). b) A ANOVA mostrou que as linhagens SHR e SLA16 não apresentam diferenças significativas na medida porcentagem da locomoção central

Nas variáveis: tempo gasto no centro e tempo na periferia do CA, a análise de ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significativas (Fig. 23a-b).

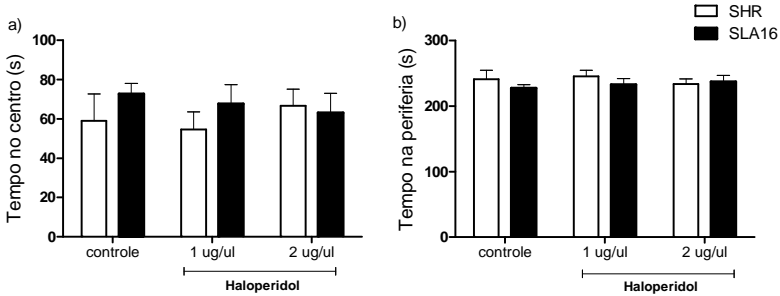


Figura 23. Tempo gasto no centro e na periferia do CA após administração Intrahipocampal de Haloperidol. a) A ANOVA não revelou diferenças significativas no tempo gasto na área central do CA. b) A ANOVA não revelou diferenças significativas no tempo gasto na área periférica do CA.

5.4.2. Haloperidol Intrahipocampal - LCE

A ANOVA de duas vias das variáveis medidas no teste LCE, não mostrou diferenças significativas quando administrado o tratamento com antagonista DRD2 Haloperidol no hipocampo dos animais. Não foram observadas diferenças no comportamento das linhagens nem um efeito do tratamento (Fig. 24a-d).

Como resumo gráfico, a tabela 3 mostra algumas das medidas avaliadas nas linhagens SHR e SLA16 após a administração IP e Intrahipocampal com o antagonista D2, Haloperidol, nos testes comportamentais CA e LCE. O traço indica que não houve modificações nas medidas avaliadas, em tanto que as setas indicam aumento ou diminuição das medidas quando elas aparecem para acima ou para abaixo, respectivamente, após a administração IP ou intrahipocampal de Haloperidol.

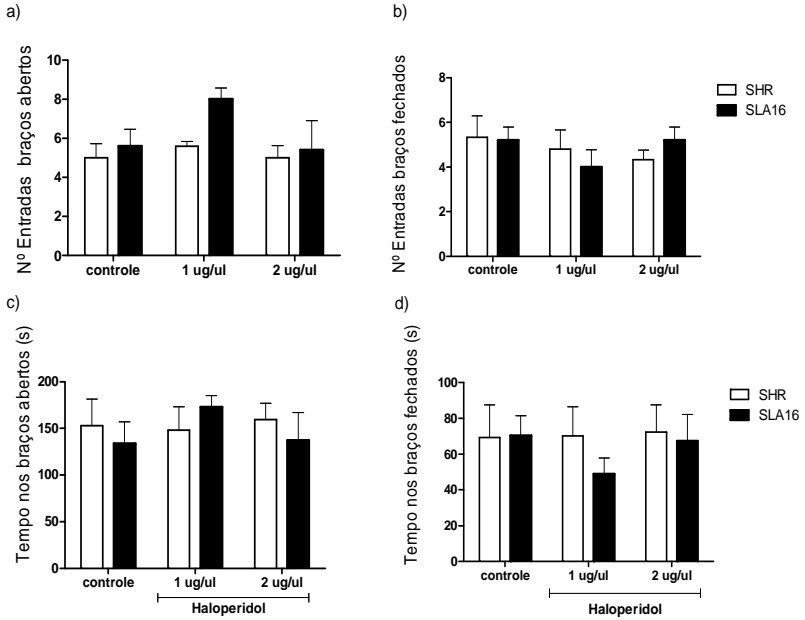


Figura 24. Número de entradas nos braços abertos e fechados, tempo gasto nos braços abertos e fechados no LCE após administração Intrahipocampal de Haloperidol. A ANOVA mostrou que as linhagens tratadas com Haloperidol intrahipocampal não apresentaram diferenças significativas para as medidas comportamentais: a) Número de entradas nos braços abertos, b) Número de entradas nos braços fechados, c) Tempo nos braços abertos e d) Tempo nos braços fechados.

HALOPERIDOL

		Intraperitoneal				Intrahipocampal			
	Linhagem	SHR		SLA16		SHR		SLA16	
	Dose	0,25 mg/kg	0,5 mg/kg	0,25 mg/kg	0,5 mg/kg	1 µg/µL	2µg/µL	1 µg/µL	2 µg/µL
CA	Loc. Ctral.	—			↓	—		—	
	Loc. Perif.	—			↓	—		—	
	Loc. Total	—			↓	—		—	
	% Loc. ctral.	↑		—		—		—	
LCE	EBA	↓		↓		—		—	
	EBF	↓		↓		—		—	
	TBA	—		—		—		—	
	TBF	—		—		—		—	

Tabela 4. Resumo gráfico do tratamento IP e Intrahipocampal com Haloperidol nas linhagens SHR e SLA16. Resultados obtidos das medidas avaliadas para os testes de CA e para LCE (traço indica que não houve mudança; seta para baixo indica diminuição; seta para acima indica aumento).

5.5.0. Quantificação por Western Blot do receptor D2 e DAT no hipocampo das linhagens SHR e SLA16.

Com o intuito de começar a analisar mais especificamente possíveis diferenças no sistema dopaminérgico das linhagens SHR e SLA16 foi realizada uma quantificação dos receptores D2 e DAT no hipocampo de 5 animais da linhagem SHR e 5 animais da linhagem SLA16.

5.5.1. Quantificação de D2

O teste- t não mostrou diferença significativa entre a quantidade do receptor D2 no hipocampo dos animais da linhagem SHR e a quantidade de D2 no hipocampo dos animais da linhagem SLA16 (Fig. 25a-b). A quantificação foi normalizada com a detecção de β -actina.

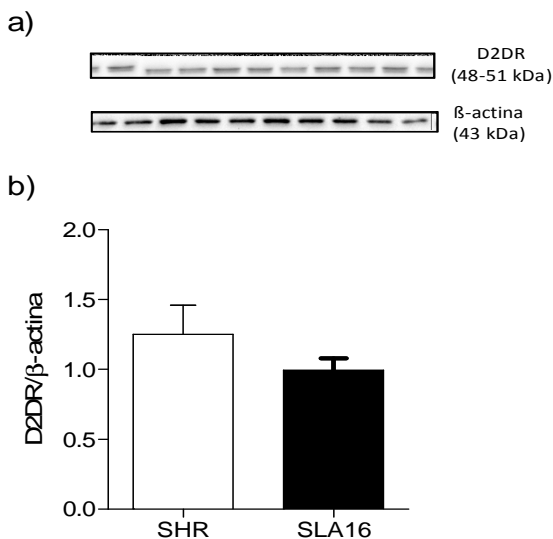


Figura 25. Quantificação por Western Blot dos receptores da família D2 no hipocampo de animais naive das linhagens SHR e SLA16. a) Fotografia das membranas reveladas com revelador automático Chemidoc (Bio-Rad) e utilizada para quantificar com o programa ImageJ. As medidas foram normalizadas em relação à β -actina, b) Gráfico resultado do test-t onde não foram observadas diferenças significativas na quantificação do receptor D2 no hipocampo das linhagens SHR e SLA16.

5.5.2. Quantificação de DAT <80

O teste-t não mostrou diferença significativa na quantificação de DAT no hipocampo de animais da linhagem SHR e os animais da linhagem SLA16 (Fig. 26a-b). A quantificação foi normalizada com a detecção de β -actina.

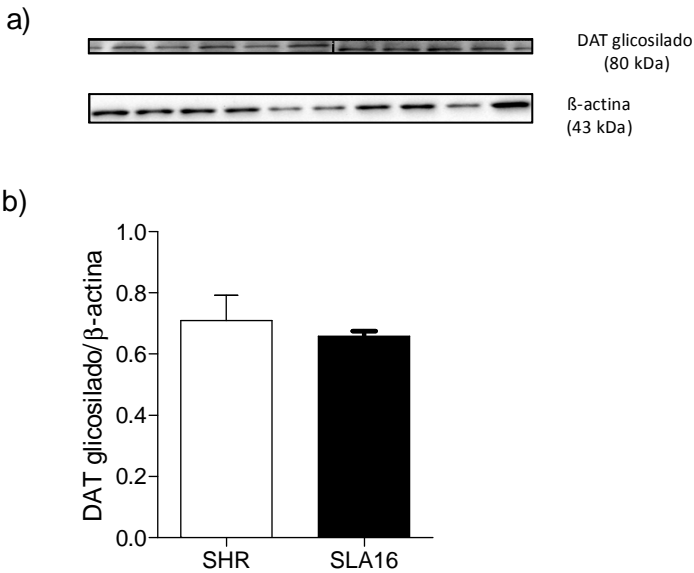


Figura 26. Quantificação por Western Blot do DAT no hipocampo de animais naive das linhagens SHR e SLA16. a) Fotografia das membranas reveladas com revelador automático Chemidoc (Bio-Rad) utilizada para quantificar com o programa ImageJ. As medidas foram normalizadas em relação à β -actina, b) Comparação de medias com teste-t. Não foram observadas diferenças significativas na quantificação do DAT no hipocampo das linhagens SHR e SLA16.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a resposta comportamental de duas linhagens de ratos, SHR e SLA16, através da utilização de fármacos que atuam no receptor dopaminérgico D2. O desenho experimental procurou estudar estas respostas a partir do tratamento farmacológico sistêmico, ou do tratamento farmacológico região específica, através de microinjeções no hipocampo ventral dos ratos de ambas as linhagens.

No presente estudo, mostramos que o **tratamento IP** com Quimpirole ou com Haloperidol provocou uma diminuição na locomoção total no CA, somente nos animais da linhagem SLA16 (Fig. 7a e 17a), sugerindo que ela pode ser mais sensível que a linhagem SHR, em relação a estes fármacos. No LCE, ambas as linhagens SHR e SLA16 apresentaram redução de locomoção em resposta ao tratamento com o Quimpirole (Fig. 9b). Já o Haloperidol parece não ter reduzido a locomoção das linhagens como visto pela distância total percorrida (Fig. 20d), apesar de que o mesmo foi efetivo em reduzir as entradas nos fechados, um clássico índice locomotor deste teste, de ambas as linhagens (Fig. 19b).

Já quando o tratamento com agonista e antagonista foi **administrado localmente no hipocampo ventral**, mostramos que o tratamento com Quimpirole provoca uma diminuição de locomoção total nas duas linhagens no CA (Fig. 12a). Por outro lado, quando o Haloperidol é administrado localmente, as linhagens não são afetadas em termos locomotores (Fig. 22a). No LCE, as linhagens SHR e SLA16 apresentaram uma redução de locomoção em resposta ao tratamento com Quimpirole (Fig. 14b), mas não com o Haloperidol (Fig. 24b).

Os experimentos também sugeriram alguns efeitos comportamentais relacionados à ansiedade/emocionalidade. Por exemplo, em resposta ao tratamento com Quimpirole IP, observamos um efeito ansiolítico nas duas linhagens no teste do CA (Fig. 7b) e no teste do LCE (Fig. 10a).

Por fim, a quantificação dos receptores D2 e do DAT no hipocampo de animais de ambas as linhagens não apresenta diferenças significativas entre as linhagens SHR e SLA16. Devido a que os alelos que codificam as famílias dos receptores dopaminérgicos estão localizados em uma região genômica idêntica entre as linhagens SHR e SLA16, podemos sugerir que as diferenças observadas no sistema

dopaminérgico, no presente estudo, podem ser resultado da influência indireta de genes localizados na região de *Anxrr16*.

Tratamento com Quimpirole – CA e LCE

Uma vez finalizada a construção da linhagem SLA16, a caracterização realizada por de Medeiros (2013) mostrou que esta nova linhagem apresenta um perfil de maior locomoção e com índices menores de comportamento relacionados à ansiedade/emocionalidade que a linhagem controle SHR. Esse perfil é resultado da avaliação dos comportamentos das linhagens nos testes do CA, T-maze e Caixa branca e Preta (de Medeiros et al., 2013). Lembrando que a SHR é uma linhagem validada como modelo de estudo de TDAH (porque reúne algumas características típicas do transtorno como falta de atenção, hiperatividade e comportamentos impulsivos) (Sagvolden T. , 2000), e que os resultados obtidos neste trabalho mostram que a linhagem SLA16 é ainda mais ativa que a linhagem SHR, o que ressalta a importância da região genômica *Anxrr16* e confirma a natureza contra intuitiva da mesma.

O Quimpirole é um fármaco que ativa seletivamente os receptores dopaminérgicos D2/D3 no cérebro (Gehlert et al., 1992). Quando as linhagens são tratadas com Quimpirole via IP, o fármaco parece ter um efeito de diminuição significativa nos índices de locomoção central, ao menos quando avaliado na forma de porcentagem (Fig. 7b). É importante salientar que o tratamento com Quimpirole faz com que a diferença comportamental basal que caracteriza as linhagens desapareça quando aplicado o tratamento com este agonista do receptor dopaminérgico. Esse efeito já tem sido observado em diversos tipos de experimentos realizados com as linhagens SHR e SLA16 e, acreditamos que, o simples fato de passar por uma injeção IP poderia ser capaz de gerar um estresse que resulte em uma alteração comportamental nos testes avaliados. Essa hipótese ainda deve ser confirmada com experimentos desenhados especificamente para tentar isolar e entender esse efeito.

Da mesma maneira, a locomoção periférica no CA (Fig. 6b) e o número de entradas nos braços fechados do LCE (Fig. 9b) revela que as linhagens apresentam um efeito geral do tratamento, no qual a locomoção esta diminuída após a aplicação do fármaco. Devemos considerar que a literatura mostra que o Quimpirole provoca um efeito bifásico na atividade locomotora dos animais. Esse efeito bifásico pode ser dependente tanto da dose administrada como do tempo de ação do

fármaco. O Quimpirole provoca uma diminuição locomotora nas primeiras 2 horas após ser administrado, provavelmente devido à ativação dos receptores D2 pré-sinápticos, e uma consequente diminuição da liberação de DA na fenda sináptica, seguido de uma segunda fase caracterizada por um aumento na locomoção, provavelmente devido à ativação dos receptores D2 pós-sinápticos (Giuffrida et al., 1999). Os receptores pré-sinápticos apresentam maior afinidade e, portanto, com menores doses e menor tempo de avaliação comportamental, os receptores pré-sinápticos são preferencialmente ativados (Usiello et al., 2000; De Mei et al., 2009). Considerando que o efeito bifásico do Quimpirole é observado ao longo de duas horas de tratamento, podemos sugerir que fomos capazes de observar somente a fase inicial do efeito, coincidindo com a diminuição da locomoção observada pelas duas linhagens na locomoção periférica.

Por outro lado, e como foi mencionado, o efeito bifásico do Quimpirole também depende da dose administrada. Porém, a literatura mostra resultados ambíguos em relação a isso. Diversos estudos mostram que doses de Quimpirole consideradas baixas podem de fato aumentar a atividade locomotora quando administrado em camundongos e que doses de Quimpirole, normalmente consideradas altas, podem provocar uma diminuição da locomoção em camundongos (Sakanoue et al., 2002). Por exemplo, em um estudo utilizando a linhagem SHR, a administração de uma dose considerada alta (1 mg/kg), mostrou uma diminuição inicial da atividade locomotora e, após 2 horas de administração, um aumento de locomoção (Giuffrida et al., 1999). No presente trabalho, o tempo da aplicação da droga antes dos animais serem colocados nos testes comportamentais foi de 30 minutos. Com base na literatura, podemos assim sugerir que ambas as doses utilizadas também podem ser consideradas altas, e que o efeito observado coincide com o trabalho realizado com a linhagem SHR. Ou seja, possivelmente observamos, neste trabalho, somente a etapa inicial do comportamento bifásico da Quimpirole. No entanto, podemos considerar a necessidade futura de testar a linhagem SLA16 e o controle SHR em um tempo mais prolongado, e a realização de uma curva dose-resposta a fim de caracterizar a resposta ao tratamento e avaliar o perfil bifásico, um experimento que foge do objetivo neste trabalho.

Finalmente, ao considerar a locomoção total podemos observar que o Quimpirole somente modifica significativamente a locomoção da linhagem SLA16 (Fig. 7a). Isso parece indicar que as linhagens SLA16 e SHR respondem diferencialmente ao tratamento, sugerindo um efeito

farmacogenético. Um efeito farmacogenético define ou reconhece que os genes tem uma importante função controlando a resposta a um fármaco que foi administrado (Pharmacogenetics of Psychotropic Drugs, 2002). Por tanto, podemos propor que os mecanismos farmacocinéticos/farmacodinâmicos, comentados anteriormente, em relação à ação da Quimpirole sofram a influência direta ou indireta do genótipo diferente destas linhagens. Mas para tentar responder totalmente as perguntas que surgem a partir deste efeito faz necessário o desenho e execução de novos estudos e experimentos. Alguns estudos podem ser dirigidos às diferentes estruturas que regulam a atividade locomotora, tal como o estriado e o núcleo *accumbens*, estudos moleculares de sensibilidade dos receptores, internalização, e qualquer outro fenômeno que condicione uma resposta diferenciada dos receptores de duas linhagens, que apresentam quase a mesma identidade genômica.

As medidas de % de locomoção central (Fig. 7b) e tempo gasto nos braços abertos no LCE (Fig. 10a) são índices de comportamentos relacionados à ansiedade. A literatura mostra que os receptores D2 estão envolvidos nos comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade. Por exemplo, um estudo com camundongos mostra que o tratamento com Quimpirole provoca aumento de comportamentos defensivos, diminuição da interação social e níveis de exploração, dados que sugerem um efeito ansiogênico em testes que envolvem interação social (Gao e Cutler, 1993). Estudos que envolvem o tratamento com Quimpirole em experimentos de medo condicionado mostram que a administração de doses baixas de Quimpirole diminui o tempo de congelamento em ratos, provavelmente como resultado da ativação dos receptores D2 pré-sinápticos, e a diminuição da concentração de DA na fenda sináptica. Esse resultado também sugere que a ativação dos mecanismos regulados pelos receptores D2 provoca uma diminuição do medo devido a um prejuízo na memória associativa (de Oliveira et al., 2006). Outro estudo utilizando camundongos mostra que a administração de doses baixas de Quimpirole resulta em um aumento no número de entradas nos braços fechados no teste LCE, diminuição da atividade locomotora e um aumento no tempo gasto nos braços fechados, sugerindo um efeito ansiogênico do tratamento, e que apresenta um comportamento dependente da dose utilizada (Rodgers et al., 1994).

O teste de LCE nos mostra que independente da dose administrada de Quimpirole, o número de vezes que animais da

linhagem SLA16 entram e o tempo gasto nos braços abertos do aparato é sempre maior em relação à linhagem SHR. Por um lado, estes resultados confirmam o perfil de caracterização inicial das linhagens (de Medeiros, 2012), e por outro lado, sugerem que a linhagem SLA16 apresenta uma preferência à área aversiva do aparato, no presente experimento.

Com o intuito de investigar o possível envolvimento da região ventral do hipocampo na regulação das emoções, duas doses do agonista do receptor D2/D3, Quimpirole, foram administradas na área ventral do hipocampo e seguidamente os animais foram avaliados no CA e LCE. Porém, alguns fatores devem ser considerados nesta discussão: Após a avaliação histológica dos cérebros dos animais testados foram considerados nas análises estatísticas aqueles animais que apresentaram a microinjeção na área ventral do hipocampo e também as microinjeções que estavam na periferia da área ventral. Esses animais injetados no limite da área foram considerados a fim de obter um número amostral que seja mais adequado no presente trabalho. Ainda que tenham sido considerados animais com microinjeções na periferia da área ventral do hipocampo, o número experimental deverá ser futuramente aumentado, pois se observam alguns resultados com erro padrão grandes, um fator que poderia ocultar possíveis resultados positivos ou negativos.

A literatura mostra uma crescente tendência a dividir o hipocampo em duas regiões que influenciam diferenciadamente diversos comportamentos. É cada vez mais evidente que a região dorsal do hipocampo se relaciona e influencia principalmente eventos relacionados à memória, enquanto que a região ventral do hipocampo parece cada vez mais estar envolvida com regulação de emoções, em especial, com comportamentos tipo ansioso (Bannerman et al., 2004; Bertoglio et al., 2006). Quando consideramos a locomoção uma medida que pode estar regulada pela região ventral do hipocampo, um estudo sugere que o aumento da atividade hipocampal dopaminérgica acompanhada do aumento na atividade locomotora é um efeito secundário da diminuição da regulação GABA. A restauração da função GABA no hipocampo ventral provoca diminuição da locomoção e restaura e normaliza a função hipocampal. Por outro lado, a hiperatividade dopaminérgica do hipocampo esta relacionada com sintomas positivos da esquizofrenia (Perez e Lodge, 2013). A esquizofrenia junto com outras doenças psiquiátricas como bipolaridade, Transtorno obsessivo compulsivo apresentam também uma comorbidade com a ansiedade (Muller et al., 2004).

No presente trabalho, o tratamento na região ventral do hipocampo com agonista D2/D3 mostra um efeito sobre a locomoção. Do mesmo modo que a restauração da função normal GABAérgica provoca diminuição na locomoção (lembrando que o GABA exerce um efeito inibitório na atividade dopaminérgica) a estimulação dos receptores D2/D3 no hipocampo ventral nas duas linhagens provoca uma diminuição da locomoção no CA e no LCE (Fig. 12a e 14b, respectivamente). Esses dados sugerem que o sistema dopaminérgico da região ventral do hipocampo influencia direta ou indiretamente na locomoção. Os valores medidos no teste mostram que o efeito não é restrito a uma área específica do CA e sim a uma diminuição na locomoção total dos animais tratados com Quimpirole. Como já foi mencionado anteriormente, o Quimpirole provavelmente exerce o efeito sobre os receptores pré-sinápticos D2 que provocam uma diminuição na síntese e liberação de DA na fenda sináptica. A diminuição da locomoção observada no presente trabalho reforça o resultado obtido por Chiavegatto et al. (2009). Eles encontraram uma relação entre níveis de expressão do gene *Sncα*, os níveis de DA no hipocampo e a locomoção nas linhagens LEW e SHR, contrastantes para comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade. Nossos resultados sugerem que o sistema dopaminérgico no hipocampo ventral está envolvido na regulação da atividade locomotora como proposto por Chiavegatto et al. (2009).

Quando analisamos a resposta à administração do agonista Quimpirole na região ventral do hipocampo no LCE se observam duas medidas importantes. Por um lado, existe uma diferença significativa entre linhagens em relação ao número de entradas nos braços abertos, na qual, a linhagem SLA16, em geral, entra mais nos braços abertos independentemente da dose administrada. Por outro lado, o tratamento mostra que é efetivo nas duas linhagens. A avaliação das linhagens neste aparato mostra novamente o caráter mais ativo da linhagem SLA16 em relação à SHR, ao menos em comportamentos realizados frente a uma novidade, comportamento basal descrito na caracterização da linhagem (de Medeiros et al., 2012). Quando analisamos o número de entradas nos braços abertos em conjunto com o tempo gasto neles observamos que enquanto o número de entradas baixa, o tempo que os grupos tratados gastam nos braços não varia. Além disso, mostra que o tratamento produz uma diminuição na atividade locomotora que coincide com o resultado observado no CA, quando os animais foram também injetados no hipocampo ventral. A literatura mostra que a

ativação de receptores pós-sinápticos aumenta a atividade locomotora, assim como valores elevados de DA extracelular podem causar efeitos ansiolíticos (Thiemann et al., 2009). Por outro lado, o envolvimento dos receptores dopaminérgicos no hipocampo ventral relacionado a comportamentos tipo ansioso foi sugerido por um estudo que mostra que o efeito produzido pela aplicação de um tratamento ansiogênico IP pode ser revertido através do bloqueio ou estimulação dos receptores D1/D2 no hipocampo ventral (Zarrindast et al., 2010). No presente trabalho, a ativação dos receptores D2/D3 com Quimpirole no hipocampo ventral provocam uma diminuição da locomoção e um efeito ansiogênico.

De uma forma geral, quando observamos as variáveis % da locomoção central no CA e tempo gasto nos braços abertos no LCE (índices clássicos de comportamento relacionado à ansiedade), podemos observar que quando Quimpirole é injetado de forma IP em ambas as linhagens aparece um efeito ansiogênico, em tanto que, quando injetado localmente no hipocampo ventral não apresenta mudanças significativas (Tabela 3). Quando analisamos as variáveis de locomoção total no CA e o número de entradas nos braços fechados (índices clássicos de locomoção), foi observado que quando Quimpirole é injetado IP, somente a linhagem SLA16 apresenta diminuição significativa na locomoção total no CA, o que indica um efeito farmacogenético. Quando Quimpirole é injetado localmente no hipocampo ventral, ambas as linhagens apresentam diminuição significativa na locomoção total, o que indica uma implicação dos receptores D2 do hipocampo ventral na regulação da locomoção (Tabela 3).

Tratamento com Haloperidol – CA e LCE

O efeito na locomoção do tratamento com Haloperidol tem sido vastamente estudado ao longo do tempo e, em geral se observa que o tratamento com diversas doses de Haloperidol injetados via IP produzem uma diminuição da atividade locomotora (Yen et al., 2013).

No presente trabalho, após a administração via IP do Haloperidol se observa na locomoção total no CA (Fig. 17a) que a linhagem SHR não apresenta diferenças significativas em resposta ao tratamento. Por outro lado, a linhagem SLA16 mostra, somente no grupo que recebeu a dose alta do tratamento, uma diminuição na locomoção total no CA. A resposta locomotora das linhagens não coincide com outros resultados obtidos com ratos da linhagem SHR (Calzavara et al., 2011). Por exemplo, Calzavara et al., 2011 descreve que uma dose baixa de Haloperidol (0.1 mg/kg) é capaz de reduzir significativamente a

locomoção em animais da linhagem SHR. As doses utilizadas neste trabalho são maiores e, ainda assim, não é observado um efeito significativo na linhagem SHR, enquanto que a linhagem SLA16 parece ser um pouco mais sensível e responde a maior das doses utilizadas. De maneira semelhante, a locomoção periférica mostra um efeito do tratamento somente na linhagem SLA16, na qual, a linhagem responde só quando administrada a dose maior de Haloperidol e provoca uma diminuição da locomoção (Fig. 16b). A linhagem SHR não apresenta efeito do tratamento nas duas doses do fármaco utilizado. Esses resultados sugerem primeiramente, que a linhagem SHR parece não responder segundo a literatura e, por outro lado, sugere que existe uma diferença entre SHR e SLA16 relacionada á regulação dos receptores dopaminérgicos D2.

Quando consideramos o tempo gasto na área central do CA, observamos que em ambas as linhagens somente um grupo dos tratados com Haloperidol responde ao tratamento. No caso da linhagem SHR, esse grupo é aquele que recebe a menor dose de Haloperidol (0.25 mg/kg) e, no caso da linhagem SLA16, o grupo que responde ao tratamento é aquele que recebe a maior dose de Haloperidol (0.5 mg/kg) (Fig. 18a). Ambos os grupos que respondem passam mais tempo no centro do CA em relação ao controle. Essa diferença sugere um efeito farmacogenético e aponta possíveis diferenças na sensibilidade dos receptores entre as linhagens. Também é importante salientar que o aumento no tempo gasto das duas doses de Haloperidol coincide com a literatura (Calzavara et al., 2009; Muthuraju et al., 2014; Yen et al., 2013). Por outro lado, a variável porcentagem da locomoção central revela que o tratamento diminui a ansiedade/emocionalidade somente nos animais SHR tratados com 0,25 mg/kg de Haloperidol (Fig. 17b). Apesar das linhagens responderem diferencialmente ao tratamento de Haloperidol, cada uma a uma dose em particular, os nossos resultados, em geral, coincidem com os dados mostrados da literatura (Calzavara et al., 2011). Portanto, os resultados obtidos no CA sugerem que o Haloperidol diminui a locomoção dos animais, tem um leve efeito na ansiedade/emocionalidade e também sugere um efeito farmacogenético nas respostas observadas.

Diferente do observado no CA, o tratamento com Haloperidol administrado nas duas linhagens mostrou um efeito geral do tratamento no teste do LCE. Considerando o número de entradas nos braços abertos e fechados, podemos observar que o tratamento com Haloperidol provoca uma diminuição nas entradas de ambos os tipos de braços (Fig.

24 a-b), o que provoca uma diminuição total das entradas nas duas linhagens. Ao considerar o tempo gasto neles, se observa que Haloperidol não modifica a preferência dos animais pelas áreas aversivas e seguras do aparato, o que sugere que seja um efeito sobre a locomoção. Um efeito amplamente descrito na literatura em relação ao Haloperidol é a capacidade de gerar sintomas de catalepsia e discinesia pela própria inibição dos receptores inibitórios D2 possivelmente no estriado (Wadenberg et al., 2001; Colombo et al., 2013). Em resumo, o Haloperidol é um antagonista que bloqueia preferencialmente os receptores D2. Estudos sugerem que provoca aumento da recaptção do neurotransmissor por estimulação do DAT e da atividade da enzima TH (Lerner et al., 1977). Em consequência, os níveis de DA extracelular aumentam, porém, a DA é incapaz de ativar os receptores e, portanto, a atividade locomotora diminui. Entretanto, não podemos deixar de considerar o fato que Haloperidol não é um fármaco específico, e por esta razão, no futuro a escolha de um antagonista mais específico para o receptor D2 nos permita ter uma ideia mais clara das respostas do sistema dopaminérgico em tratamentos periféricos. Apesar de que o número de entradas nos braços fechados e número de entradas totais representam índices locomotores neste aparato, o presente resultado deve ser interpretado com cautela. Com o intuito de medir um possível efeito sedativo do tratamento com Haloperidol, avaliamos as medidas de distância percorrida e velocidade no LCE sendo que não foram observadas diferenças significativas para nenhuma destas variáveis (Fig. 20c-d). Assim, com o uso de *softwares* especializados e medidas comportamentais mais precisas, não observamos um efeito sedativo nestes animais e sim apenas uma redução da exploração do aparato.

Da mesma maneira que com o tratamento com Quimpirole, foi realizado o análise dos diferentes comportamentos após a administração local no hipocampo ventral com Haloperidol. Diferente dos efeitos observados na locomoção quando o Quimpirole é administrado no hipocampo ventral, o tratamento com Haloperidol não modifica os níveis de locomoção nas linhagens SHR e SLA16. Esse resultado coincide com os dados da literatura que sugerem que bloqueio dos receptores D2 não altera a atividade locomotora (Zarrindast et al, 2010). Porém, as medidas de locomoção central e locomoção periférica no CA nos permite observar novamente que a linhagem SLA16 é mais ativa que a linhagem SHR como observado anteriormente (de Medeiros et al., 2013). Além de não provocar mudanças locomotoras no CA, não se observam diferenças no tempo gasto nas diferentes áreas do aparato. Em

conjunto, esses resultados sugerem que o tratamento não produz efeitos significativos na locomoção destes animais. Considerando que a literatura mostra que o bloqueio dos receptores D2 com Sulpirida (antagonista D2 específico) não altera a locomoção (Zarrindast et al., 2010), podemos sugerir que o efeito observado talvez não seja devido ao fato de que o Haloperidol não é um bloqueador específico dos receptores D2, e sim pelo fato dele bloquear a sinalização ativada pelos receptores D2 pós-sinápticos.

O teste do LCE mostra que o tratamento com Haloperidol na região ventral do hipocampo também não teve efeito nas medidas analisadas. O número de entradas nos braços abertos e fechados não são modificadas pelo bloqueio dos receptores D2. Em relação ao tempo gasto nos braços abertos e fechados também não apresentam diferenças significativas. Esses resultados não coincidem com o estudo realizado com sulpirida por Zarrindast et al. (2010), no qual, o bloqueio dos receptores D2 no hipocampo ventral provoca um efeito ansiolítico. Eles também não coincidem com o aumento da concentração de DA extracelular que pode provocar efeitos ansiolíticos como sugerido por Ono et al. (2015). Em base nos resultados observados do tratamento região específica de Haloperidol, provavelmente a influencia na locomoção deve-se a uma estrutura diferente do hipocampo. Lembrando que o efeito de tratamento com Haloperidol foi significativo quando administrado de forma IP, podemos sugerir que a diminuição observada pelo tratamento IP deva-se a estruturas como estriado como mostrado na literatura (Lerner et al., 1977; Wadenberg et al., 2001). Além disso, não podemos descartar que as doses utilizadas no presente estudo, não tenham sido efetivas em demonstrar um efeito comportamental visível nestas linhagens. Também, sugerimos que novas cirurgias devam ser realizadas a fim de completar o número experimental, além de realizar experimentos com o uso de um antagonista com maior afinidade dos receptores D2 e especificidade. Finalmente o estudo com fármacos agonistas e antagonistas dos receptores D1 em experimentos administrados localmente e periféricamente nos permitirá estudar e analisar a resposta dopaminérgica completa das linhagens SHR e SLA16 e sua relação com os comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade.

De uma forma geral, quando observamos as variáveis % da locomoção central no CA e tempo gasto nos braços abertos no LCE, podemos observar que quando Haloperidol é injetado de forma IP, somente o grupo da linhagem SHR que foi tratado com a menor dose,

apresenta um aumento na porcentagem de locomoção central no CA, em tanto que, a linhagem SLA16 não apresenta diferenças significativas, indicando um efeito farmacogenético (Tabela 4). Quando Haloperidol é injetado localmente no hipocampo ventral, não se observam diferenças significativas nas variáveis avaliadas (Tabela 4). Quando analisamos as variáveis de locomoção total no CA e o número de entradas nos braços fechados, foi observado que quando Haloperidol é injetado IP, somente o grupo da linhagem SLA16 que recebeu a dose maior apresenta diminuição significativa na locomoção total no CA, o que indica um efeito farmacogenético em relação à SHR. Quando Haloperidol é injetado localmente no hipocampo ventral, não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das linhagens, o que indica que o bloqueio dos receptores D2 do hipocampo ventral não parece influenciar a regulação da locomoção (Tabela 4).

Quantificação dos receptores da família D2 e do transportador de DA no hipocampo de animais das linhagens SHR e SLA16

Segundo o RGD, o gene que codifica os receptores D2 em ratos, localiza-se no cromossomo 8, entanto que o gene que codifica o transporta DAT encontra-se no cromossomo 1. Após ter obtido os resultados com ambos os fármacos, o resultado observado com o tratamento com Quimpirole e Haloperidol IP abre uma pergunta muito importante a ser respondida não apenas com um experimento. Como duas linhagens que são geneticamente idênticas na região que codifica os receptores dopaminérgicos, podem responder de forma diferente em relação a um tratamento farmacológico que afeta somente os receptores? A maior vantagem de contar com duas linhagens que são idênticas, com exceção da região específica do cromossomo 4 que influencia na emocionalidade (Bice et al., 1998; Ramos et al., 1999; Chiavegatto et al., 2009), é que as diferenças observadas em medidas que avaliam os comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade devem ter origem nesta região diferenciada. Para começar a entender o efeito farmacogenético observado no tratamento com Quimpirole e Haloperidol, realizamos a quantificação dos receptores D2 e DAT do hipocampo dos animais das linhagens SHR e SLA16. Os resultados do *Western Blot* mostram que as linhagens não apresentam diferenças no número de receptores D2 e DAT no hipocampo. Embora não sejam diferentes em termos numéricos, não significa que o funcionamento não seja diferente. Ou seja, diferenças na sensibilidade dos receptores D2

das linhagens SHR e SLA16 poderiam explicar o efeito farmacogenético observado no tratamento com Quimpriole e Haloperidol. A quantificação dos receptores D2 e DAT é o primeiro de vários estudos moleculares necessários. Dentre esses estudos, a análise de expressão genica do *Snc*a (localizado no QTL *Axnrr16*) como a expressão proteica no hipocampo é fundamental para analisar a possível influencia da α -sinucleína na regulação do sistema dopaminérgico nas respostas relacionadas à emocionalidade/ansiedade, como sugerido por Chiavegatto et al., (2009).

7. CONCLUSÕES

- Administração IP sugere que a região *Anxrr16* pode estar regulando de forma indireta os receptores D2 no SNC de ambas as linhagens.
- A ativação no hipocampo ventral dos receptores D2 parece estar envolvida na regulação da locomoção.
- A inibição no hipocampo ventral dos receptores D2 parece não estar envolvida na regulação da locomoção.
- A quantificação obtida dos receptores D2 e DAT não explica a resposta diferenciada observada entre as linhagens, porém, deve ser tido em conta que a funcionalidade como também a sensibilidade são fatores que não é capaz de mostrar a quantificação, por tanto, não sabemos se os receptores e os transportadores em ambas as linhagens são iguais ou não.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abi-Dargham, A. (2004). Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol.*, (Suppl 1):S1–5.
2. Anzalone, A., Lizardi-Ortiz, J., Ramos, M., De Mei, C., Hopf, F., Iaccarino, C., et al. (2012). Dual control of dopamine synthesis and release by presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *J Neurosci*, 32, 9023–9034.
3. Arai, A., Tomiyama, M., Kannari, K., Kimura, T., Suzuki, C., Watanabe, M., et al. (2008). Reuptake of L-DOPA-derived extracellular DA in the striatum of a rodent model of Parkinson's disease via norepinephrine transporter. *Synapse*, 62 (8), 632-5.
4. Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. (2015). Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol. Jan*;172(1):1-23.
5. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev. Mar*;63(1):182-217.
6. Bannerman, D., Rawlins, J., McHugh, S., Deacon, R., Yee, B., Bast, T., et al. (2004). Regional dissociations within the hippocampus, memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.*, 28 (3), 273-83.
7. Bello, E., Mateo, Y., Gelman, D., Noain, D., Shin, J., Low, M., et al. (2011). Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat Neurosci*, 14, 1033–1038.
8. Benoit-Marand, M., Ballion, B., Borrelli, E., Boraud, T., & Gonon, F. (2011). Inhibition of dopamine uptake by D2 antagonists: an in vivo study. *J Neurochem*, 116, 449–458.
9. Bertoglio, L., Joca, S., & Guimaraes, F. (2006). Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 183–188.
10. Bice, P., Foroud, T., Bo, R., Castelluccio, P., Lumeng, L., Li, T., et al. (1998). Genomic screen for QTLs underlying alcohol consumption in the P and NP rat lines. *Mamm Genome.*, 949-55.
11. Bjorklund, A., & Dunnett, S. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*, 30(5), 194-202.
12. Blackburn, J., Pfaus, J., & Phillips, A. (1992). Dopamine functions in appetitive and defensive behaviours. *Prog Neurobiol.*, 39(3), 247-79.
13. Berridge KC, Kringelbach ML. (2015). Pleasure systems in the brain. *Neuron. May 6*; 86(3):646-64
14. Bowers, M., Chen, B., & Bonci, A. (2010). AMPA receptor synaptic plasticity induced by psychostimulants: the past, present, and therapeutic future. *Neuron.*, 67(1), 11-24.

15. Brodnik Z, Double M, Jaskiw GE. (2013) Presynaptic regulation of extracellular dopamine levels in the medial prefrontal cortex and striatum during tyrosine depletion. *Psychopharmacology (Berl)*. May;227(2):363-71.
16. Bryda, E. C. (2013). The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Missouri Medicine*, v. 110, n. 3, p. 207-211.
17. Butler, A., & Hodos, W. (2005). *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation*. Wiley-Liss: Hoboken, NJ, USA.
18. Calzavara, M., Levin, R., Medrano, W., Almeida, V., Sampaio, A., Barone, L., et al. (2011). Effects of antipsychotics and amphetamine on social behaviors in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res.*, 225(1), 15-22.
19. Calzavara, M., Medrano, W., Levin, R., Kameda, S., Andersen, M., Tufik, S., et al. (2009). Neuroleptic drugs revert the contextual fear conditioning deficit presented by spontaneously hypertensive rats: a potential animal model of emotional context processing in schizophrenia? *Schizophr Bull*, 35(4), 748-59.
20. Cannon, W. (1927). The James-Lange theory of emotions: A critical examination and an alternative theory. *Am. J. Psychol.*, 106-124.
21. Carr, L., Foroud, T., Bice, P., Gobbett, T., Ivashina, J., Edenberg, H., et al. (1998). A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. *Alcohol Clin Exp Res*, 22(4), 884-7.
22. Cavalcanti JR, Soares JG, Oliveira FG, Guzen FP, Pontes AL, Sousa TB, Cavalcante JS, Nascimento ES Jr, Cavalcante JC, Costa MS. (2014). A cytoarchitectonic and TH-immunohistochemistry characterization of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area and retrorubral field in the rock cavy (*Kerodon rupestris*). *J Chem Neuroanat*. Jan;55:58-66.
23. Chiavegatto, S., Izidio, G., Mendes-Lana, A., Aneas, I., Freitas, T., Torrão, A., et al. (2009). Expression of alpha-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. *Mol Psychiatry*, 14(9), 894-905.
24. Colombo, A., de Oliveira, A., Reimer, A., & Brandão, M. (2013). Dopaminergic mechanisms underlying catalepsy, fear and anxiety: do they interact? *Behav Brain Res.*, 257, 201-7.
25. Dahlstroem, A., & Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand*, 231-255.

26. de la Mora, M., Gallegos-Cari, A., Arizmendi-García, Y., Marcellino, D., & Fuxe, K. (2010). Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Prog Neurobiol.*, 90(2), 198-216.
27. de Medeiros, G. (2012). Caracterização fenotípica e molecular da linhagem congênica de ratos SHR.LEW-anxrr16 como um novo modelo genético para o estudo da ansiedade. Dissertação no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina , Florianópolis.
28. de Medeiros, G., Pereira, E., Granzotto, N., & Ramos, A. (2013). Low-anxiety rat phenotypes can be further reduced through genetic intervention. *PLoS One*, 8(12): e83666.
29. De Mei, C., Ramos, M., Iitaka, C., & Borrelli, E. (2009). Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol.*, 9(1), 53-8.
30. de Oliveira, A., Reimer, A., & Brandão, M. (2006). Dopamine D2 receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. *Pharmacol Biochem Behav.*, 84(1), 102-11.
31. Di Chiara, G., & Imperato, A. (Jul de 1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 85(14), 5274-8.
32. DMS-V. (2013). American psychiatric association: diagnostic and statistical manual of mental disorders. Arlington, VA: American Psychiatric Association. p 194- 195. 2013.
33. Engel JA, Jerlhag E. (2014). Alcohol: mechanisms along the mesolimbic dopamine system. *Prog Brain Res.*; 211:201-33
34. Fields, H., Hjelmstad, G., Margolis, E., & Nicola, S. (2007). Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu Rev Neurosci.*, 30, 289-316.
35. Finlay, J. M., J., Zigmond, M., & Abercrombie, E. (1995). Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. *Neuroscience*, 64(3), 619-28.
36. Flores AJ, Bartlett MJ, So LY, Laude ND, Parent KL, Heien ML, Sherman SJ, Falk T.(2014) Differential effects of the NMDA receptor antagonist MK-801 on dopamine receptor D1- and D2-induced abnormal involuntary movements in a preclinical model. *Neurosci Lett.* Apr 3;564:48-52
37. Floresco, S., Todd, C., & Grace, A. (2001). Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of

- ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurosci.*, 21(13), 4915-22.
38. Gainetdinov, R., Sotnikova, T., & Caron, M. (2002). Monoamine transporter pharmacology and mutant mice. *Trends Pharmacol Sci.*, 23(8), 367-73.
 39. Gao, B., & Cutler, M. (1993). Effects of quinpirole on the behaviour shown by mice in the light-dark box and during social interactions. *Neuropharmacology*, 93-100.
 40. Gao J, Li M. (2014). Differential effects of intermittent versus continuous haloperidol treatment throughout adolescence on haloperidol sensitization and social behavior in adulthood. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Oct3;54:67-75.
 41. Gehlert, D., Gackenheim, S., Seeman, P., & Schaus, J. (1992). Autoradiographic localization of [³H]quinpirole binding to dopamine D2 and D3 receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol.*, 211(2), 189-94.
 42. Giuffrida, A., Parsons, L., Kerr, T., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., & Piomelli, D. (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neuroscience*, 2(4), 358-63.
 43. Gomes Dias, Paula (2015). Caracterização fenotípica dos efeitos do QTL *Anxrr16* através do uso de ratas das linhagens congênica SLA16 e SHR. Florianópolis. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Graduação em Biologia. Universidade Federal de Santa Catarina.
 44. Griffin AM, Cleveland HH, Schlomer GL, Vandenberg DJ, Feinberg ME. (2015). Differential Susceptibility: The Genetic Moderation of Peer Pressure on Alcohol Use. *J Youth Adolesc*. Oct;44(10):1841-53.
 45. Hong SB, Zalesky A, Park S, Yang YH, Park MH, Kim B, Song IC, Sohn CH, Shin MS, Kim BN, Cho SC, Kim JW. (2015). COMT genotype affects brain white matter pathways in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Hum Brain Mapp*. Jan; 36(1):367-77.
 46. Hua G, Xiaolei L, Weiwei Y, Hao W, Yuangang Z, Dongmei L, Yazhuo Z, Hui Y. (2015) Protein phosphatase 2A is involved in the tyrosine hydroxylase phosphorylation regulated by α -synuclein. *Neurochem Res*. Mar;40(3):428-37.
 47. Izídio, G., Oliveira, L., Oliveira, L., Pereira, E., Wehrmeister, T., & Ramos, A. (2011). The influence of sex and estrous cycle on QTL for emotionality and ethanol consumption. *Mamm Genome*, 22(5-6), 329-40.
 48. James, W. (1884). What is an emotion? . *Mind* , ox-IX, 188–205.
 49. Kalisch, R., Schubert, M., Jacob, W., Kessler, M., Hemauer, R., Wigger, A., et al. (2006). Anxiety and hippocampus volume in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 31(5), 925-32.

50. Kim IH, Rossi MA, Aryal DK, Racz B, Kim N, Uezu A, Wang F, Wetsel WC, Weinberg RJ, Yin H, Soderling SH. (2015). Spine pruning drives antipsychotic-sensitive locomotion via circuit control of striatal dopamine. *Nat Neurosci.* Jun;18(6):883-91.
51. Kleinridders A, Cai W, Cappellucci L, Ghazarian A, Collins WR, Vienberg SG, Pothos EN, Kahn CR. (2015). Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 17;112(11):3463-8.
52. Kodavanti, U., Schladweiler, M., Ledbetter, A., Watkinson, W., Campen, M., Winsett, D., et al. (2000). The spontaneously hypertensive rat as a model of human cardiovascular disease: evidence of exacerbated cardiopulmonary injury and oxidative stress from inhaled emission particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol*, 3(164), 250-63.
53. Kuhn FT, Dias VT, Roversi K, Vey LT, de Freitas DL, Pase CS, Roversi K, Veit JC, Emanuelli T, Bürger ME. (2015). Cross-Generational trans Fat Consumption Favors Self-Administration of Amphetamine and Changes Molecular Expressions of BDNF, DAT, and D1/D2 Receptors in the Cortex and Hippocampus of Rats. *Neurotox Res.* Jul 19.
54. Lange, C. (1885). The mechanism of the emotions. In *The Emotions*; Dunlap, D., Ed.; Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, 33-92.
55. Langen, B., & Dost, R. (2011). Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animal models: effect of dopamine D1 and alpha2 agonists. *Atten Defic Hyperact Disord*, 3(1), 1-12.
56. Laruelle, M., & Abi-Dargham, A. (1999). Dopamine as the wind of psychotic fire: new evidence from brain imaging studies. *Journal of Psychopharmacology.*, 13(4), 358–371.
57. Lerner, P., Nosé, P., Gordon, E., & Lovenberg, W. (8 de Jul de 1977). Haloperidol: effect of long-term treatment on rat striatal dopamine synthesis and turnover. *Science*, 197, 181-3.
58. Liang SL, Hsu SC, Pan JT. (2014). Involvement of dopamine D2 receptor in the diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity and prolactin secretion in female rats. *J Biomed Sci.* 2014 May 3;21:37.
59. Lindgren, N., Usiello, A., Gojny, M., Haycock, J., Erbs, E., Greengard, P., et al. (2003). Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4305– 4309.

60. Lodge, D., & Grace, A. (2007). Aberrant hippocampal activity underlies the dopamine dysregulation in an animal model of schizophrenia. *J Neurosci.*, 27, 11424–11430.
61. Lou H, Montoya SE, Alerte TN, Wang J, Wu J, Peng X, Hong CS, Friedrich EE, Mader SA, Pedersen CJ, Marcus BS, McCormack AL, Di Monte DA, Daubner SC, Perez RG. (2010). Serine 129 phosphorylation reduces the ability of alpha-synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* Jun 4;285(23):17648-61.
62. Lyons, D., Hellysaz, A., & Broberger, C. (2012). Prolactin regulates tuberoinfundibular dopamine neuron discharge pattern: novel feedback control mechanisms in the lactotrophic axis. *J Neurosci.*, 32(23), 8074-83.
63. Lyons, D., Yang, C., Sawyer-Glover, A., Moseley, M., & Schatzberg, A. (2001). Early life stress and inherited variation in monkey hippocampal volumes. *Arch Gen Psychiatry*, 1145–1151.
64. Ma H, Zhu G. (2014). The dopamine system and alcohol dependence. *Shanghai Arch Psychiatry.* Apr;26(2):61-8.
65. Medeiros, G., Corrêa, F., Corvino, M., Izídio, G., & Ramos, A. (2014). The Long Way from Complex Phenotypes to Genes: The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects. *World Journal of Neuroscience*, 4, 203-215.
66. Moriyama, Y., & Futai, M. (1990). H(+)-ATPase, a primary pump for accumulation of neurotransmitters, is a major constituent of brain synaptic vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*, 443–448.
67. Mormede, P., Moneva, E., Bruneval, C., Chaouloff, F., & Moisan, M. (2002). Marker-Assisted Selection of a Neuro-Behavioural Trait Related to Behavioural Inhibition in the SHR Strain, an Animal Model of ADHD. *Genes, Brain and Behavior*, 1, 111-116.
68. Muller, J., Koen, L., Soraya, S., Emsley, R., & Stein, D. (2004). Anxiety disorders and schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep.*, 6(4), 255-61.
69. Muthuraju, S., Nobre, M., Saito, V., & Brandão, M. (2014). Distinct effects of haloperidol in the mediation of conditioned fear in the mesolimbic system and processing of unconditioned aversive information in the inferior colliculus. *Neuroscience.*, 7(261), 195-20.
70. Naef L, Gjerde E, Long H, Richard D, Walker CD. (2014). Neonatal onset of leptin signalling in dopamine neurones of the ventral tegmental area in the rat. *J Neuroendocrinol.* Dec;26(12):835-43.
71. Ono, Y., Koizumi, S., & Onozuka, M. (2015). Chewing Prevents Stress-Induced Hippocampal LTD Formation and Anxiety-Related

- Behaviors: A Possible Role of the Dopaminergic System. *Biomed Res Int*.
72. Ostroumov A, Thomas AM, Dani JA, Doyon WM. (2015). Cigarettes and alcohol: The influence of nicotine on operant alcohol self-administration and the mesolimbic dopamine system. *Biochem Pharmacol*. Aug 5.
 73. Papez, J. (1937). A proposed mechanism for emotion. *Arch Neurol Psychiatry*, 725–743.
 74. Pereira, E. (2010). Desenvolvimento de uma linhagem congênica para um locus no cromossomo 4 do rato com efeito sobre a emocionalidade. Florianópolis: Tese (Doutorado em Farmacologia. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.
 75. Perez, S., & Lodge, D. (2013). Hippocampal interneuron transplants reverse aberrant dopamine system function and behavior in a rodent model of schizophrenia. *Mol Psychiatry*., 18(11), 1193-8.
 76. Pharmacogenetics of Psychotropic Drugs, Edited by Bernard Lerer, 2002.
 77. Phillips, P., Hancock, P., & Stamford, J. (2002). Time window of autoreceptor-mediated inhibition of limbic and striatal dopamine release. *Synapse*, 44, 15–22.
 78. Plouffe B, Tiberi M. (2013). Functional analysis of human D1 and D5 dopaminergic G protein-coupled receptors: lessons from mutagenesis of a conserved serine residue in the cytosolic end of transmembrane region 6. *Methods Mol Biol*.;964:141-80.
 79. Potenza, M., Brodtkin, E., Joe, B., Luo, X., Remmers, E., Wilder, R., et al. (2004). Genomic regions controlling corticosterone levels in rats. *Biol Psychiatry*, 6(55), 634-41.
 80. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. GOLAN, David E. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
 81. Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 3-33.
 82. Ramos, & Mormède, P. (1998a). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic Approach. *Neurosci Biobehav Rev.*, 22(1), 33-57.
 83. Ramos, A., Berton, O., Mormede, P., & Chaouloff, F. (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behavioural Brain Research*, v. 85, n 1., 57-69.
 84. Ramos, A., Mellerin, Y., Mormède, P., & Chaouloff, F. (1998b). A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behav Brain Res.*, 96(1-2), 195-205.

85. Ramos, A., Moisan, M., Chaouloff, F., Mormede, C., & Mormede, P. (1999). Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. *Molecular Psychiatry*, 4(5), 453-462.
86. Rat Genome Database www.rgd.mcw.edu/wg/home. (s.d.).
87. Ribeiro AB, Leite CM, Kalil B, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Szawka RE. (2015) Kisspeptin regulates tuberoinfundibular dopaminergic neurones and prolactin secretion in an oestradiol-dependent manner in male and female rats. *J Neuroendocrinol*. Feb; 27(2):88-99.
88. Rocchetti J, Isingrini E, Dal Bo G, Sagheby S, Menegaux A, Tronche F, Levesque D, Moquin L, Gratton A, Wong TP, Rubinstein M, Giros B. (2015). Presynaptic D2 dopamine receptors control long-term depression expression and memory processes in the temporal hippocampus. *Biol Psychiatry*. Mar 15;77(6):513-25.
89. Rodgers, R., Nikulina, E., & Cole, J. (1994). Dopamine D1 and D2 receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.*, 49(4), 985-95.
90. Rodrigues LS, Targa AD, Nosedá AC, Aurich MF, Da Cunha C, Lima MM. (2014). Olfactory impairment in the rotenone model of Parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. *Front Cell Neurosci*. Dec 1;8:383
91. Rothman SM, Griffioen KJ, Vranis N, Ladenheim B, Cong WN, Cadet JL, Haran J, Martin B, Mattson MP. (2013). Neuronal expression of familial Parkinson's disease A53T α -synuclein causes early motor impairment, reduced anxiety and potential sleep disturbances in mice. *J Parkinsons Dis.*;3(2):215-29.
92. Sagvolden, T. (2000). Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(1), 31-39.
93. Sagvolden, T. (2000). Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neurosci Biobehav Rev.*, 31-9.
94. Sakanoue, M., Mori, N., Takei, N., Kawai, M., Tani, K., Suzuki, K., et al. (2002). Tacrolimus, a specific inhibitor of calcineurin, modifies the locomotor activity of quinpirole, but not that of SKF82958, in male rats. *Eur J Pharmacol*, 438(1-2), 93-7.
95. Sato H, Kato T, Arawaka S. (2013). The role of Ser129 phosphorylation of α -synuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: a review of in vivo models. *Rev Neurosci.*;24(2):115-23.

96. Schachter, S., & Singer, J. (1962). Cognitive, social, and physiological determinants of emotional state. *Psychol. Rev.* , 379–399.
97. Schmidt TT, Rea E, Shababi-Klein J, Panagis G, Winter C. (2013). Enhanced reward-facilitating effects of d-amphetamine in rats in the quinpirole model of obsessive-compulsive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* Jun;16(5):1083-91
98. Shah, A., & Lodge, D. (2013). A loss of hippocampal perineuronal nets produces deficits in dopamine system function: relevance to the positive symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry.*, 13, 215.
99. Shamsizadeh, A., Pahlevani, P., Haghparast, A., Moslehi, M., Zarepour, L., & Haghparast, A. (2013). Involvement of dopamine receptors within the dorsal hippocampus in suppression of the formalin-induced orofacial pain. *Pharmacol Biochem Behav.*, 114-115:37-42.
100. Simms SL, Huettner DP, Kortagere S. (2015). In vivo characterization of a novel dopamine D3 receptor agonist to treat motor symptoms of Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* Apr 18. pii: S0028-3908(15)00133-1.
101. Sutton LP, Caron MG. Essential role of D1R in the regulation of mTOR complex1 signaling induced by cocaine. *Neuropharmacology.* 2015 Aug 24;99:610-619.
102. Talpos J, Aerts N, Waddell J, Steckler T. MK-801 and amphetamine result in dissociable profiles of cognitive impairment in a rodent paired associates learning task with relevance for schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 2015 Apr 23.
103. Terenina-Rigaldie, E., Jones, B., & Mormède, P. (2003b.). Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats. *Genes Brain Behav*, 3(2), 125-31.
104. Terenina-Rigaldie, E., Moisan, M., Colas, A., Beaugé, F., Shah, K., Jones, B., et al. (2003a). Genetics of behaviour: phenotypic and molecular study of rats derived from high- and low-alcohol consuming lines. *Pharmacogenetics*, 9(13), 543-54.
105. Thiemann, G., Watt, C., Ledent, C., Molleman, A., & Hasenöhr, R. (2009). Modulation of anxiety by acute blockade and genetic deletion of the CB(1) cannabinoid receptor in mice together with biogenic amine changes in the forebrain. *Behav Brain Res.*, 200(1), 60-7.
106. Tretham, D., Townes, A., & Kang, A. (1977). Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 146(3), 857-868.
107. Truong, J., Newman, A., Hanson, G., & Fleckenstein, A. (2004). Dopamine D2 receptor activation increases vesicular dopamine uptake

- and redistributes vesicular monoamine transporter-2 protein. *Eur J Pharmacol* 504:27–32. *Eur J Pharmacol*, 504, 27–32.
108. Usiello, A., Baik, J., Rouge´-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., et al. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*, 199-203.
 109. Wadenberg, M., Soliman, A., VanderSpek, S., & Kapur, S. (2001). Dopamine D(2) receptor occupancy is a common mechanism underlying animal models of antipsychotics and their clinical effects. *Neuropsychopharmacology*, 25, 633–641.
 110. Wersinger, C., Prou, D., Vernier, P., & Sidhu, A. (2003). Modulation of dopamine transporter function by alpha-synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress. *FASEB J*.
 111. Wersinger C, Sidhu A. Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci Lett*. 2003 Apr 17;340(3):189-92.
 112. Wilkerson, A., & Levin, E. (1999). Ventral hippocampal dopamine D1 and D2 systems and spatial working memory in rats. *Neuroscience*, 89(3), 743-9.
 113. Wise, R. (2005). Forebrain substrates of reward and motivation. *J Comp Neurol.*, 493(1), 115-21.
 114. Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci*. 5(6), 483-94.
 115. Wu, Q., Reith, M., Walker, Q., Kuhn, C., Carroll, F., & Garris, P. (2002). Concurrent autoreceptor-mediated control of dopamine release and uptake during neurotransmission: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci*, 22, 6272–6281.
 116. Yee AG, Lee SM, Hunter MR, Glass M, Freestone PS, Lipski J. (2014). Effects of the Parkinsonian toxin MPP+ on electrophysiological properties of nigral dopaminergic neurons. *Neurotoxicology*. Dec; 45:1-11.
 117. Yen, Y., Anderzhanova, E., Bunck, M., Schuller, J., Landgraf, R., & Wotjak, C. (2013). Co-segregation of hyperactivity, active coping styles, and cognitive dysfunction in mice selectively bred for low levels of anxiety. *Front Behav Neurosci*, 15(7), 103.
 118. Yetnikoff L, Lavezzi HN, Reichard RA, Zahm DS. (2014) An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience*. Apr 13;282C:23-48.
 119. Youdim, M., Edmondson, D., & Tipton, K. (2006). The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci.*, 7(4), 295-309.

120. Zarrindast MR, Khakpai F. (2015). The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Arch Iran Med.* Sep;18(9):591-603.
121. Zarrindast, M., Naghdi-Sedeh, N., Nasehi, M., Sahraei, H., Bahrami, F., & Asadi, F. (2010). The effects of dopaminergic drugs in the ventral hippocampus of rats in the nicotine-induced anxiogenic-like response. *Neurosci Lett.*, 475(3), 156-60.
122. Zhu Y, Zhang J, Zeng Y. (2012)Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* Jun 1;11(4):350-8. Review.

The Long Way from Complex Phenotypes to Genes: The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects

Gabriela Ferreira de Medeiros^{1,2}, Fernanda Junkes Corrêa¹, Maria Elisa Corvino¹, Geison de Souza Izidio¹, André Ramos¹

¹Laboratório de Genética do Comportamento, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

²Univ Bordeaux, Nutrition & Neurobiologie Intégrée (NutriNeuro), Bordeaux, France
Email: g.izidio@ufsc.br

Received 2 May 2014; revised 31 May 2014; accepted 5 June 2014

Copyright © 2014 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Quantitative trait loci (QTLs) mapping has been performed during the past decades in an attempt to identify genes, gene products and mechanisms underlying numerous quantitative traits. It's a strategy based on natural variations in genes and gene products, which facilitates translation from animal models to human clinical conditions. Our team has shown that the inbred rat strains Lewis (LEW) and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) differ with respect to several emotionality-related behaviors, one of which (inner locomotion in the open field) was strongly influenced by a QTL (*Anxrr16*) on rat chromosome 4. Since then, several other studies not only corroborated the initial description of *Anxrr16*, but also extrapolated its effects to a broader context (rats from both sexes and regardless of the estrous cycle phase) and suggested that this same region influences other emotionality-related behaviors as well as alcohol intake. Other QTLs affecting neurobiological traits were also found on rat chromosome 4 and several candidate genes have been pointed out as possibly influencing those phenotypes. Altogether, these studies suggest that rat chromosome 4 constitutes an interesting target for the study of the molecular bases of anxiety and other traits related to emotional reactivity.

Keywords

Rat Chromosome 4, QTL *Anxrr16*, Emotionality-Related Behaviors, Alcohol Consumption, Stress-Response

ANEXO II

Projeto imagine

O Projeto Imagine é um projeto de solidariedade internacional que visa a inclusão científica e o intercâmbio cultural entre os povos. Através dele, a UFSC, em conjunto com suas instituições parceiras, levará conhecimentos elementares de ciência a comunidades de diferentes países, onde haja difícil acesso à educação formal e à informação científica.

O conhecimento científico básico, sobre nós próprios e o universo que nos cerca, é indispensável para a construção da cidadania, do respeito entre os povos e do diálogo entre as culturas, rumo à erradicação de preconceitos e à promoção do desenvolvimento humano. Jovens de minorias étnicas, de grupos indígenas ou que simplesmente vivem em zonas rurais afastadas, tendo que percorrer grandes distâncias ou se deslocar por terrenos difíceis para chegar à escola, tendem a se tornar estigmatizados e com baixa confiança em si mesmos.

A curiosidade, a vontade de aprender e o prazer da descoberta são características comuns a todos os seres humanos, em qualquer cultura, em qualquer tempo e em qualquer canto da Terra.

O projeto, em um longo prazo, poderá envolver vários ciclos, cada ciclo consistindo de diversos módulos científicos que circularão entre diferentes países. O projeto atualmente executa dois ciclos que abordam temáticas diferentes da ciência. Cada um desses módulos circulará por cinco países parceiros. O primeiro módulo: “DNA, diversidade e hereditariedade” e o segundo módulo: “Energia”.

Objetivos do projeto

1. Através do conhecimento, alargar horizontes e apresentar novas perspectivas de vida a jovens e adultos de comunidades remotas, sejam eles estudantes, professores, lideranças ou simplesmente membros da comunidade.
2. Contribuir para o despertar da curiosidade científica, para a preservação dos ambientes e culturas tradicionais e para a amizade entre os povos, promovendo uma maior compreensão (e consequente aceitação) das diferenças e semelhanças entre indivíduos, etnias, povos e culturas.
3. Contribuir para a transição harmoniosa entre velhas tradições do patrimônio cultural e uma visão científica da realidade, não opondo

nem impondo uma à outra, mas dando um senso de continuidade a ambas.

4. Através do convívio e da interação pessoal de cientistas e estudantes universitários com as comunidades locais, desmistificar a imagem da ciência, e do cientista e despertar futuros disseminadores de conhecimento.

Atividades realizadas (2013-2015)

Módulo I: DNA, diversidade e hereditariedade. Organizar e executar as atividades de biologia molecular. Essas atividades foram realizadas na UFSC (padronização das técnicas moleculares a serem aplicadas a campo e, padronizar, organizar e produzir material necessário para cada uma das visitas realizadas pelo projeto) e nas visitas do projeto em cada uma das comunidades (executar atividades que envolvem manipulação de técnicas de biologia molecular, produção de dados para discussão durante a visita).

Participação nas três visitas realizadas pelo Projeto Imagine do módulo I: comunidade de Coxilha Rica e Aldeia Guarani no estado de Santa Catarina, Brasil e, da primeira etapa internacional no Vale Sagrado dos Incas, Peru.

Projeto Imagine

<http://projetoimagine.ufsc.br/>

<https://www.facebook.com/UFSCProjetoImagine?fref=ts>