



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Campus Universitário - Florianópolis SC - 88040-970, Brasil
Tel: (48) 3721-2066/ (48) 3721-9712

Rafaela Venturi de Souza

**AVALIAÇÃO DE ENDOFENÓTIPOS DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE
ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE EM RATAS DAS LINHAGENS SHR E SLA16**

Florianópolis

2019

RAFAELA VENTURI DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE ENDOFENÓTIPOS DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE
ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE EM RATAS DAS LINHAGENS SHR E SLA16**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial
para a conclusão do Curso de
Graduação em Farmácia

Orientador: Prof. Dr Geison de Souza
Izídio

Co-Orientadora: Ma. Natalli Granzotto

Florianópolis

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiro queria agradecer à minha família, aos meus pais que sempre valorizaram muito a educação, e não mediram esforços para que eu tivesse a melhor possível. Sempre falavam: o conhecimento é algo que ninguém consegue tirar de você. Por sempre me apoiarem e me incentivarem e guiarem quando as dúvidas sobre o futuro apareciam. À minha irmã que é minha melhor amiga e minha confidente e conselheira. A pessoa que mais me conhece e entende. Agradeço muito pela nossa relação de companheirismo.

À minha madrinha que mesmo longe sempre se faz presente e sempre é tão preocupada comigo. Ao meu namorado que mais escutou esse TCC incansavelmente e tentava me ajudar mesmo não entendendo do assunto. Sempre me incentivou, me deu colo quando preciso e teve toda a paciência do mundo nos meus momentos mais estressantes.

Ao pessoal do Laboratório de Genética do Comportamento por me ensinarem tanto e fazerem eu ver a ciência com outros olhos. Em especial ao Guilherme que me auxiliou tanto durante minha iniciação científica, a Jéssica que se tornou minha amiga pessoal, uma pessoa com um alto astral e louquinha do jeito dela. A Naty que foi minha grande professora durante minha iniciação e que hoje se tornou ainda minha co-orientadora e amiga. Muito obrigada pela paciência, pela orientação e ensinamentos de sempre e ao suporte essencial que você me deu durante a execução desse trabalho. Ao Geison que é um professor e pessoa incrível, que tem um amor pela ciência admirável.

Às Unidas da Zika, a quem devo minhas melhores recordações da faculdade, obrigada por tornarem essa fase tão inesquecível que irei guardar com tanto amor. Em especial à Luiza e à Letícia que são minhas amigas desde a infância, que mesmo longe e apesar de às vezes ficarmos dias sem nos falar, mostram que nada muda e que nossa amizade permanece ali intacta.

À CAPES e ao Cnpq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um distúrbio psiquiátrico que se caracteriza pela manifestação de três sintomas principais: desatenção, hiperatividade e impulsividade. É diagnosticado com maior frequência em crianças e adolescentes, podendo permanecer também ao longo da idade adulta. O modelo mais utilizado em estudos de pesquisa básica, hoje, são os ratos da linhagem espontaneamente hipertensos (SHR). Entretanto, eles apresentam algumas limitações para o estudo deste transtorno. Em função disso, este trabalho avaliou endofenótipos do TDAH nas linhagens SHR e congênica SLA16 (SHR.Lewis/Anxrr16), com a perspectiva de propor um modelo genético alternativo. Para avaliação de parâmetros locomotores e de emocionalidade foram realizado dois testes com ratas de ambas as linhagens: o teste do campo aberto e o teste da caixa de atividade. Em ambos, as fêmeas da linhagem SLA16 apresentaram uma maior hiperatividade e um comportamento menos ansioso, quando comparadas com as fêmeas SHR. Além disso, ambas as linhagens habituaram aos dois aparatos, apesar de que isso ocorreu de uma maneira mais acentuada na caixa de atividade. Assim, nós demonstramos que a linhagem SLA16 pode apresentar hiperatividade exacerbada e menor nível de ansiedade/emocionalidade de maneira sustentada em relação à linhagem SHR, o que faz deste modelo genético uma ferramenta importante no estudo do TDAH.

Palavras chave: Hiperatividade, Emocionalidade, Campo Aberto, Fêmeas.

ABSTRACT

Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD) is a common neurobehavioral disorder characterized by the manifestation of three symptoms: inattention, hyperactivity and impulsivity. It is usually diagnosed in children and adolescents, but may also persist throughout adulthood. The most widely used model in basic research today is the Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). As it presents some limitations for the study of this disorder, this work evaluated some of ADHD endophenotypes in SHR and SLA16 (SHR.Lewis/Anxrr16) congenic strains, with the objective of proposing this strain as an alternative genetic model. To measure the locomotion and emotional parameters, two tests were carried out with female rats of both strains: the open field test and the activity box test. In both tests, SLA16 females showed greater locomotion and less anxious behavior when compared to SHR females. In addition, both strains habituated to the two apparatuses, although this occurred in a more pronounced way in the activity box test. Thus, we demonstrated that the SLA16 strain may present exacerbated hyperactivity, and a lower level of anxiety/emotionality in a sustained manner than the SHR strain, which would make this genetic model an important tool in the study of ADHD.

Keywords: Hyperactivity, Emotionality, Open Field, Females.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação simplificada da neurotransmissão dopaminérgica	16
Figura 2 - Principais vias dopaminérgicas do Sistema Nervoso Central	17
Figura 3 - Modelos animais propostos para o estudo do TDAH em ratos e camundongos.....	18
Figura 4 - Representação figurativa do genoma das linhagens SHR, LEW e SLA16	21
Figura 5 - Campo Aberto	27
Figura 6 - Caixa de Atividade	28
Figura 7 - Distância total, periférica e central percorridas no CA	29
Figura 8 - Porcentagem de locomoção central no CA.....	31
Figura 9 - Tempo de permanência no centro do CA	32
Figura 10 - Locomoção total na CAtiv	33
Figura 11 – Número de cruzamentos a cada 5 minutos na CAtiv	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Evolução clínica do TDAH da infância a adolescência.....	10
Quadro 2 - Critérios de diagnóstico de acordo com DMS-V.....	12
Quadro 3 - Apresentação clínica do TDAH em cada gênero	14

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
Anxrr16	Anxiety related response QTL 16 (QTL para respostas relacionadas à ansiedade 16)
CA	Campo Aberto
CAtiv	Caixa de Atividade
DAT	Transportador de Dopamina
HPA	Hipotálamo- Hipófise- Adrenal
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LCEM	Labirinto em Cruz Elevado Modificado
LEW	Lewis
MAO	Monoamina Oxidase
NAT	Transportador da Noradrenalina
QTL	<i>Locus</i> para Características Quantitativas
SLA16	SHR.Lewis/Anxrr16
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
VMAT	Transportador Vesicular de Monoaminas
WKY	Wistar-Kyoto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE	10
1.1.1 TDAH no sexo feminino	13
1.2 NEUROBIOLOGIA	15
1.2.1 Dopamina	15
1.3 MODELOS ANIMAIS DO TDAH	17
1.3.1 Linhagem SHR	19
1.3.2 Linhagem SLA 16	20
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 ANIMAIS	26
4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS	26
4.2.1 Campo Aberto	26
4.2.2 Caixa de Atividade	27
4.2.3 Análises Estatísticas	28
5 RESULTADOS	29
5.1 EXPERIMENTO 1: CAMPO ABERTO REPETIDO 1 HORA	29
5.2 EXPERIMENTO 2: CAIXA DE ATIVIDADE REPETIDO 1 HORA.....	32
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO 1 – Protocolo PP00903	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) caracteriza-se por uma tríade de sintomas básicos: hiperatividade, desatenção e impulsividade (DMS-V, 2013). A evolução clínica geral desse transtorno está descrita no quadro 1.

Quadro 1- Evolução clínica do TDAH da infância a adolescência.

Fases	Características
Lactante	Bebê difícil, insaciável, irritado e de difícil consolo, com maior prevalência de cólicas, dificuldades de alimentação e sono.
Pré-escolar	Atividade aumentada ao usual, dificuldades de ajustamento, teimosia, irritação e extremamente difícil de satisfazer.
Escola Elementar	Incapacidade de colocar foco, distração, impulsivo, desempenho inconsciente, presença ou não de hiperatividade.
Adolescência	Inquieto e com desempenho inconsistente, sem conseguir colocar foco, dificuldade de memória na escola, abuso de substância, acidentes.

Fonte: Adaptado de Rohde et. al. (2004).

Estima-se que ele seja uma das principais causas do encaminhamento das crianças ao sistema de saúde (SANTOS; VASCONCELOS, 2010). Acometendo cerca de 5% das crianças e 2,5% dos adultos (DSM-V, 2013). Apesar de se mostrar mais prevalente em crianças e adolescentes em fase escolar, atingindo cerca de 5,7 a 7,1% dessa faixa etária (POLANCZYK et al., 2007), cerca de 50 a 65% das crianças diagnosticadas continuam a apresentar severos sintomas até a vida adulta (SANTOS; VASCONCELOS, 2010; FARAONE; BIEDERMAN, 2005). Estudos apontam uma tendência à diminuição dos sintomas de hiperatividade ao decorrer do seu crescimento, diferente dos sintomas de desatenção que tendem a permanecer ao longo dos anos (SWANSON et al., 1998). Perante os sexos a prevalência é de 9:1 a 2,5:1 (meninos: meninas), entretanto, pesquisas já apontam um aumento da incidência entre meninas (ANDRADE et al., 2011).

O TDAH possui uma etiologia multifatorial proveniente tanto de fatores ambientais como de fatores genéticos (COUTO; MELO-JUNIOR; GOMES, 2010). Dentre os fatores ambientais, a exposição ao fumo e álcool durante a gestação pode

elevar o risco do desenvolvimento do transtorno. Já os fatores genéticos têm se mostrado importantes nas pesquisas realizadas com gêmeos *monozigóticos*, *dizigóticos* e estudos de adoção as quais constataam uma herdabilidade maior que 70% (COUTO; MELO-JUNIOR; GOMES, 2010; ROHDE; HALPERN, 2004). Além disso, em aproximadamente 50% dos casos de TDAH estão associados com outras comorbidades psiquiátricas. Dentre elas, destaca se o Transtorno de Conduta e Transtorno Opositor Desafiante, com aproximadamente 30% a 50%, e os Transtornos de Ansiedade, com 25% (SANTOS; VASCONCELOS, 2010).

O diagnóstico do TDAH é estabelecido a partir do histórico clínico do paciente, não possuindo nenhum marcador biológico, ou teste laboratorial, que comprove seu diagnóstico (TRIPP et al., 2009). Diretrizes para essa análise clínica foram determinadas pelo Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais (DSM). Elas estabelecem a necessidade de pelo menos seis sinais de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade (Quadro 2). Além disso, o DSM-V preconiza que esses devem se manifestar antes dos 12 anos de idade, em mais de um ambiente (escola, trabalho, casa), de uma maneira significativamente prejudicial ao indivíduo e com uma duração mínima de seis meses.

Categorizam-se as manifestações clínicas do TDAH em três subtipos: predominantemente hiperativo (cerca de 5%), predominantemente desatento (entre 10 e 15%) ou o quadro combinado (aproximadamente 80%) (ANDRADE et al., 2011). Crianças que apresentam o primeiro subtipo se mostram mais agressivas e tendem ser rejeitadas pelos colegas, já as do segundo tipo exibem dificuldade acadêmica e as do terceiro retratam um dano perante todo o funcionamento (SANTOS; VASCONCELOS, 2010). Além disso, estudos indicam uma maior prevalência do subtipo desatento entre o sexo feminino (DSM-V, 2013; SANTOS; VASCONCELOS, 2010).

Quadro 2 - Critérios de diagnóstico de acordo com DSM-V

Subtipo	Critérios
Desatenção	<p>Frequentemente não presta atenção em detalhes ou comete erros por descuido em tarefas escolares, no trabalho ou durante outras atividades.</p> <p>Frequentemente tem dificuldade de manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas.</p> <p>Frequentemente parece não escutar quando alguém lhe dirige a palavra diretamente.</p> <p>Frequentemente não segue instruções até o fim e não consegue terminar trabalhos escolares, tarefas ou deveres no local de trabalho.</p> <p>Frequentemente tem dificuldade para organizar tarefas e atividades.</p> <p>Frequentemente evita, não gosta ou reluta em se envolver em tarefas que exijam esforço mental prolongado.</p> <p>Frequentemente perde coisas necessárias para tarefas ou atividades.</p> <p>Com frequência é facilmente distraído por estímulos externos.</p> <p>Com frequência é esquecido em relação a atividades cotidianas.</p>
Hiperativo Impulsivo	<p>Frequentemente remexe ou batuca as mãos ou os pés ou se contorce na cadeira.</p> <p>Frequentemente levanta da cadeira em situações em que se espera que permaneça sentado.</p> <p>Frequentemente corre ou sobe nas coisas em situações em que isso é inapropriado. (Nota: Em adolescentes ou adultos, pode se limitar a sensações de inquietude.)</p> <p>Com frequência é incapaz de brincar ou se envolver em atividades de lazer calmamente.</p> <p>Com frequência “não para”, agindo como se estivesse “com o motor ligado”.</p> <p>Frequentemente fala demais.</p> <p>Frequentemente deixa escapar uma resposta antes que a pergunta tenha sido concluída.</p> <p>Frequentemente tem dificuldade para esperar a sua vez.</p> <p>Frequentemente interrompe ou se intromete.</p>

Fonte: Adaptado de DSM-V (2013).

1.1.1 TDAH no sexo feminino

Como já apresentado anteriormente há uma diferença geral de subtipo entre os gêneros, sendo as meninas mais desatentas e os meninos mais hiperativos/impulsivos. Tendo também uma prevalência superior dos meninos nos diagnósticos, apesar dessa diferença diminuir quando referente a adultos (5,4% em homens para 3,2% em mulheres) (KESSLER et al., 2006), todavia as mulheres tendem a serem diagnosticadas mais tarde (GREVET et al., 2006). Isso leva as mulheres apresentarem sintomas mais graves (OHAN; VISSER, 2009).

A clínica apresentada pelo sexo feminino pode ser uma das causas desse diagnóstico tardio. Uma vez que os sintomas por elas apresentados (esquecimento, desorganização, baixa autoestima, ansiedade) não são tão evidentes quanto os do sexo masculino. Por isso, normalmente quem nota os sintomas em meninas são os pais, não os professores (OHAN; VISSER, 2009), visto que os professores as comparam com os garotos e os pais com as outras garotas (QUINN; MADHOO, 2014). Vale ressaltar que nem sempre a dificuldade acadêmica e/ou deficiência de aprendizado será evidente desde cedo, pois as meninas tendem a se dedicar muito para atingir as expectativas dos pais e professores e esconder/superar as dificuldades. Logo a baixa produtividade pode aparecer só quando o nível de exigência se torna maior do que elas conseguem lidar, principalmente no ensino superior (QUINN, 2005).

Além disso, as mulheres e meninas costumam internalizar seus sintomas e, assim, se tornarem ansiosa, depressivas e sofrerem com desregulação emocional (ROBINSON et al., 2008; QUINN, 2005). A presença dessas comorbidades, sendo elas independentes ou consequências do TDAH, dificulta ainda mais o diagnóstico do transtorno. Levando assim a um diagnóstico equivocado. Dessa maneira meninas com TDAH são comumente tratadas para depressão antes de serem diagnosticadas com TDAH (QUINN, 2005). Corroborando com isso Quinn e Wigal (2014) reportaram que 14% das meninas com TDAH tomavam antidepressivos antes de serem tratadas para esse transtorno, em comparação com apenas 5% dos meninos.

A clínica do subtipo hiperativo e impulsivo no gênero feminino, por sua vez, também se difere da apresentada pelo gênero masculino. As meninas tendem a ser mais falantes e/ou distúrbios emocionais do que terem uma hiperatividade motora (QUINN, 2005), todavia são diagnosticadas erroneamente para o transtorno bipolar

(QUINN, 2005; WAITE, 2007). Além disso, elas possuem um maior risco de cometer abuso de substâncias e promiscuidade (QUINN, 2005), apesar de haver controvérsias na literatura. Em uma pesquisa entre os professores foram relatados atitudes sexuais mais promíscuas em meninas com TDAH (44%) do que em meninos com o transtorno (28%) (QUINN; WIGAL, 2014). Vale ressaltar que esse resultado foi obtido pela observação de professores, os quais podem avaliar uma atitude como promíscua das meninas, porém essa mesma ser avaliada como normal nos meninos. Essa diferença de julgamento é comum, visto que os conceitos na sociedade diferem perante os sexos.

Essas diferenças clínicas observadas em meninos e meninas (resumidas no Quadro 3) exemplifica que o desenvolvimento do transtorno ocorre de maneiras diferentes em cada gênero ressaltando a importância de se estudar cada um deles. Para isso a necessidade da inserção do gênero feminino nas pesquisas científicas.

Quadro 3 - Apresentação clínica do TDAH em cada gênero

Variável	Gênero	
	Feminino	Masculino
Subtipo predominante	Desatento	Hiperativo/Impulsivo
Demonstração dos sintomas	Internaliza	Externaliza
Comorbidades psiquiátricas comuns	Ansiedade Depressão Transtorno Opositor Desafiador	Depressão Transtorno de Conduta Transtorno por uso de substâncias
Mecanismo de enfrentamento	Esforço acadêmico/ profissional	
Outros	Percepção de problemas acadêmicos, depressão e baixa autoestima mais frequentes. Comportamento promíscuo. Maior autoavaliação. Dificuldade de se relacionar com colegas.	Percepção de perturbação em sala de aula é mais comum. Imprudência ao volante.

Fonte: Adaptado de Quinn e Madhoo (2014).

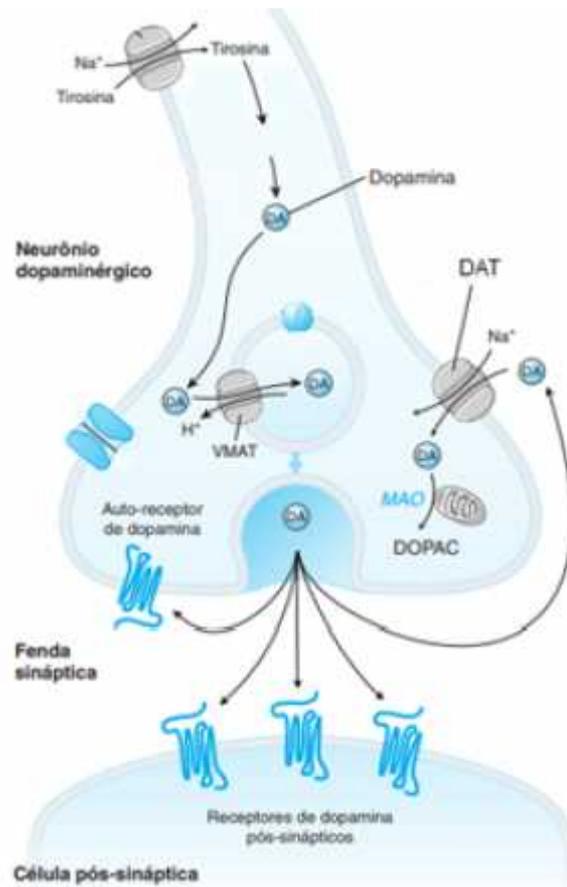
1.2 NEUROBIOLOGIA

A principal hipótese considera que a neurobiologia do TDAH decorre de uma hipofunção dopaminérgica nas regiões frontal, subcortical e límbica principalmente. Além disso, pesquisas apontam que também ocorre a participação do sistema noradrenérgico (COUTO; MELO-JUNIOR; GOMES, 2010; FARAONE; BIEDERMAN, 2005). Essas hipóteses são reforçadas pelo fato de que inibidores da recaptação da dopamina (metilfenidato) e da noradrenalina (antidepressivos tricíclicos) ocasionam uma melhora da sintomatologia do TDAH (BIEDERMAN; SPENCER, 1999; SEEMAN; MADRAS, 1998). Além disso, estudos genéticos apontam que a maioria dos genes envolvidos nesse transtorno estão ligados ao sistema das catecolaminas, como, por exemplo, o gene codificador do transportador da dopamina (DAT), do transportador da noradrenalina (NAT) e dos receptores dopaminérgicos D4 e D5 (COUTO; MELO-JUNIOR; GOMES, 2010).

1.2.1 Dopamina

A dopamina é sintetizada a partir da tirosina, proveniente da alimentação, no citoplasma do neurônio, e então transportada para as vesículas de armazenamento através da proteína transportadora vesicular de monoaminas (VMAT). Com a estimulação do neurônio, a VMAT funde-se com a membrana e libera a dopamina na fenda sináptica. Depois de liberada, a dopamina possui algumas opções. A primeira é interagir com os receptores pós-sinápticos acoplados à proteína G, os quais são divididos em duas famílias. A família D1 (receptores D1 e D5) que tem função excitatória e a família D2 (receptores D2, D3 e D4) com função inibitória. As outras opções seriam de se ligar aos receptores pré-sinápticos D2, ou de ser recaptada pelo neurônio pré-sináptico pelo DAT. Após a recaptação, a dopamina pode ser reciclada voltando para as vesículas pela VMAT ou degradadas pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) (STANDAERT; GALANTER, 2009), esquematizado na figura 1.

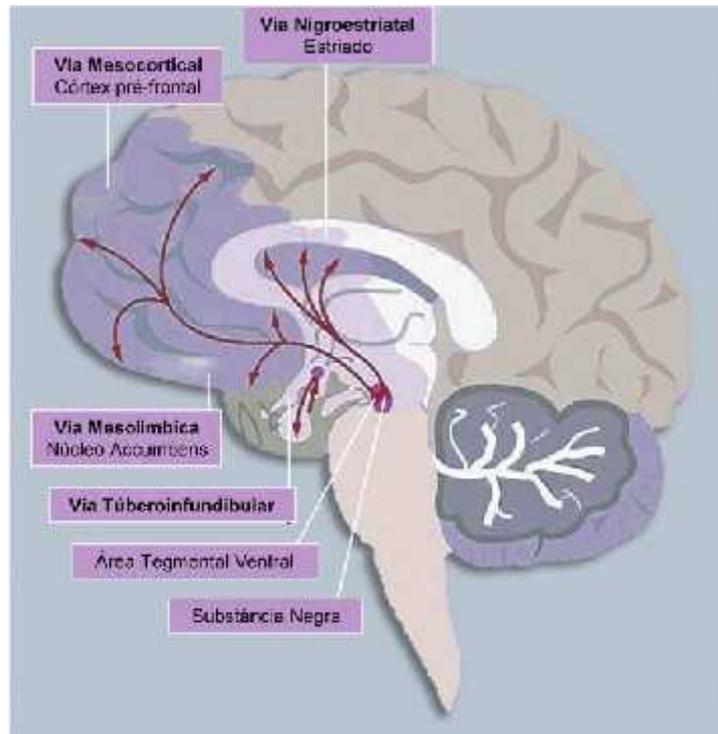
Figura 1- Representação simplificada da neurotransmissão dopaminérgica



Fonte: Adaptado de Standaert e Galanter (2009).

Como representado na figura 2, o cérebro contém quatro principais vias dopaminérgicas: a mesocortical, responsável pelo controle da função cognitiva (memória, atenção, planejamento e flexibilidade comportamental); a mesolímbica, pelas respostas de prazer e reforço positivo; a nigroestriatal, pelo controle motor, e a tuberoinfundibular; pela regulação hormonal. Os corpos celulares neuronais dessas vias se encontram na área tegmentar ventral (mesocortical e mesolímbica), na substância negra (nigroestriatal) ou, ainda, no núcleo arqueado do hipotálamo (tuberoinfundibular). Eles se projetam para o córtex pré-frontal, para o núcleo *accumbens* do estriado, para o estriado e para a hipófise, respectivamente (BRESSAN; CRIPPA, 2005; CARLEZON; THOMAS, 2009; ERNST; LUCIANA, 2015; FLORESCO; MAGYAR, 2006; ROMANOS et al., 2010). Por isso, em relação ao desenvolvimento sintomatológico do TDAH, o córtex pré-frontal e o estriado são classicamente consideradas as regiões cerebrais mais importantes.

Figura 2 - Principais vias dopaminérgicas do Sistema Nervoso Central



Fonte: Ernst e Luciana (2015); Adaptado por Granzotto (2016).

1.3 MODELOS ANIMAIS DO TDAH

Por aproximadamente 150 anos, são desenvolvidos modelos animais para o estudo do mecanismo, da causa e da terapia de doenças humanas (FAGUNDES et al., 2004), uma vez que esses possibilitam condições padronizadas e controladas de experimentação, o que não é possível com os humanos (JACOB, 2010). Porém, para que um animal sirva de modelo, é necessário que ele possua características semelhantes ao referencial e seja de fácil manipulação (FAGUNDES et al., 2004). Por atender a essas especificações, os roedores estão sendo muito utilizados em pesquisas biomédicas. Além disso, em relação à genética e fisiologia, os roedores possuem uma alta similaridade com os humanos (BRYDA, 2013).

Contudo existem limitações para o uso de modelos animais no estudo de transtornos psiquiátricos, uma vez que os transtornos humanos possuem fortes características subjetivas que não podem ser avaliadas em animais (DAVIDS et al., 2003; SAGVOLDEN et al., 2005). Para uma melhor padronização, que permita uma análise clara e objetiva, é necessário que se estabeleçam critérios para validar o modelo. No caso do TDAH, o modelo precisa validar tanto os fatores de analogia (endofenótipos de impulsividade motora, hiperatividade e prejuízos nas tarefas que

exigem atenção sustentada), como os fatores de homologia (predisposições genéticas, disfunções neuroestruturais e funcionais compatíveis com o TDAH, disfunções nas vias dopaminérgicas e em outras vias monoaminérgicas), e ainda como os fatores preditivos (resposta aos fármacos utilizados na clínica do tratamento do TDAH) (SAGVOLDEN et al., 2005).

Nenhum dos modelos animais usados hoje foi desenvolvido com o propósito de abranger as propriedades multifatoriais e genéticas do TDAH (MAJDAK et al., 2016). Por isso, apesar da grande quantidade de modelos animais com características hiperativas, poucos cumprem com todos os critérios necessários, como observado na figura 3.

Figura 3 - Modelos animais propostos para o estudo do TDAH em ratos e camundongos.

MODELO ANIMAL	PREDITIVO	HOMOLOGIA		ANALOGIA		
	Metilfenidato	DAT	D4	Hiperatividade	Desatenção	Impulsividade
Lesão neonatal com 6-OHDA ^a	Sim	-	Sim	Sim	Sim	-
Modelo da hipóxia neonatal	-	Não	-	Sim	-	-
Modelo BrdU-neonatal	Não	-	-	Sim	-	-
Stunting cerebelar	Não	-	-	Sim	-	-
Irradiação cerebelar	-	-	-	Sim	Sim	-
SHR	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Ratos WKHA	Não	-	-	Sim	Sim	Sim
Ratos NHE	-	Sim	-	Sim	Sim	-
Camundongos running	Sim	-	-	Sim	-	-
Camundongos coloboma	Não	-	-	Sim	-	-
Camundongos acallosal	-	-	-	Sim	Sim	-
Camundongos DAT KO	Sim	Sim	-	Sim	-	Sim
Camundongos DAT KD	-	Sim	-	Sim	-	Sim
Mutações na tireóide	Não	-	-	Sim	Sim	Sim
Rato hipoessexual	-	-	-	Sim	Sim	-

Fonte: Adaptado de Pandolfo (2010).

Dentre os modelos representados acima, os mais estudados são os ratos neonatos lesionados com 6-hidroxi dopamina (6-OHDA), os ratos *Naple* com alta excitabilidade (NHE), os camundongos *knockout* para o DAT (DAT KO) e, principalmente, os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (RUSSELL; SAGVOLDEN; JOHANSEN, 2005).

1.3.1 Linhagem SHR

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) surgiu a partir da seleção de ratos Wistar-Kyoto (WKY). Inicialmente foram selecionados ratos que apresentavam elevada pressão arterial sistólica. Com sucessivos cruzamentos dessa seleção, os pesquisadores japoneses Okamoto e Aoki (1963) obtiveram ratos isogênicos que desenvolvem naturalmente hipertensão arterial (BEIERWALTES; ARENDSHORST; KLEMER, 1982).

Os ratos da linhagem SHR são, atualmente, o modelo animal mais utilizado para o estudo do TDAH. Isso se deve ao fato dessa linhagem apresentar algumas características relacionadas ao transtorno, como uma hipofunção dopaminérgica (RUSSELL et al., 1998), que corrobora com a teoria dopaminérgica do desenvolvimento do TDAH. A neuropatologia causadora dessa hipofunção nos SHRs seria decorrente do armazenamento vesicular precário do neurotransmissor no córtex pré-frontal e núcleo *accumbens* (NAc) (RUSSELL et al., 1998), da expressão aumentada dos receptores D1 e D5 no estriado e NAc (CAREY et al., 1998), do aumento do metabólito da dopamina no hipocampo dos SHRs (CHIAVEGATTO et al., 2009) e, também, da alta expressão do transportador DAT e do receptor D2 (RUSSELL et al., 1998; 2000). Além disso, os ratos SHR apresentam fenótipos compatíveis com os principais sintomas vistos em paciente com TDAH: atenção sustentada deficiente, impulsividade motora e hiperatividade (SAGVOLDEN et al., 2000; 2005).

Entretanto, a linhagem SHR apresenta certas limitações como modelo para o estudo do TDAH. Dentre elas, se destaca a hipertensão espontânea (DAVIDS et al., 2003; SAGVOLDEN et al., 2005), que nem sempre está associada ao TDAH em humanos. Além disso, a utilização dos fármacos psicoestimulantes no tratamento do TDAH poderia prejudicar ainda mais o funcionamento cardiovascular (WINTERSTEIN et al., 2009).

Apesar de muitos considerarem que a linhagem SHR responde ao fator preditivo do TDAH por possuir uma resposta positiva ao metilfenidato (MYERS, MUSTY & HENDLEY, 1982; SAGVOLDEN et al., 1992), outros pesquisadores apontam que a administração de metilfenidato na adolescência dos SHR ocasiona um aumento nos índices experimentais de ansiedade na fase adulta (VENDRUSCOLO et al., 2008).

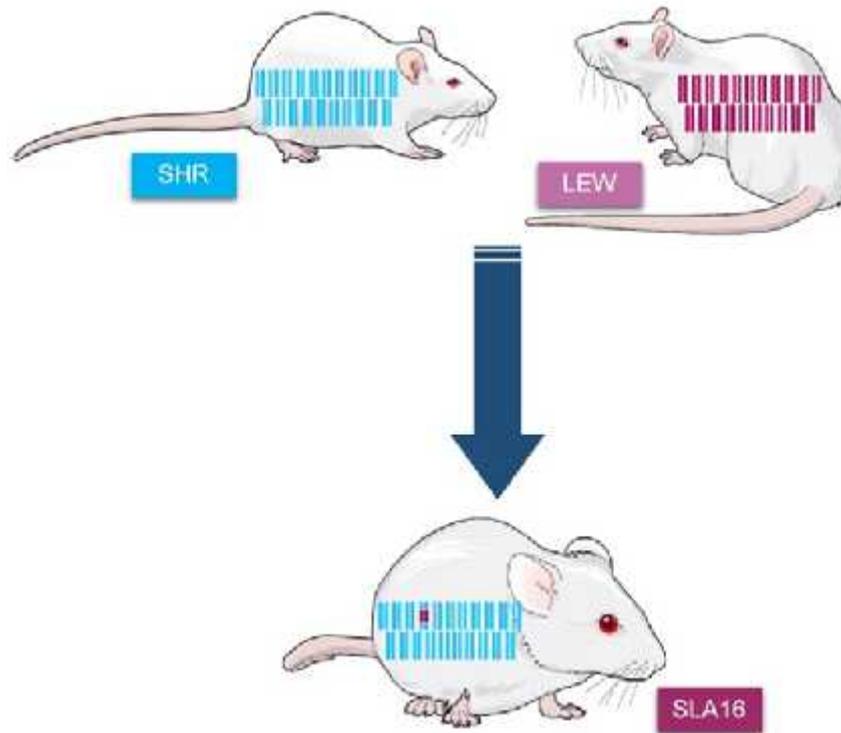
1.3.2 Linhagem SLA16

Em 1997, Ramos e colaboradores demonstraram, em diferentes testes comportamentais, que a linhagem SHR se aproximava mais das áreas aversivas que a linhagem Lewis (LEW), porém suas atividades locomotoras não se distinguiram. Em razão disso, constataram que os ratos SHR possuem um comportamento menos “ansioso” que os ratos LEW.

Após um estudo realizado com inter cruzamentos dessas linhagens, a diferença comportamental observada anteriormente foi atribuída a fatores genéticos (RAMOS et al., 1998). Numa busca por essa base genética, os pesquisadores identificaram, através de uma análise de QTL realizada com os animais F2 desses inter cruzamentos (híbridos), o *locus* Anxrr16 no cromossomo 4. O qual demonstrou influenciar na locomoção central do campo aberto, uma medida comportamental indicativa de emocionalidade.

A fim de investigar a influência desse *locus* sobre esses tipos de comportamentos, principalmente o “tipo ansioso”, desenvolveu-se, no Laboratório de Genética do Comportamento na Universidade Federal de Santa Catarina, a linhagem SLA16 (SHR.Lewis/Anxrr16). Sua construção ocorreu por meio de sucessivos retrocruzamentos entre as linhagens SHR (receptora) e LEW (doadora), resultando num genoma inteiramente da linhagem SHR, com exceção do *locus* de interesse proveniente da linhagem LEW (MEDEIROS et al., 2013), como representado na figura 4.

Figura 4 - Representação figurativa do genoma das linhagens SHR, LEW e SLA16.



Fonte: Adaptado de Granzotto (2016).

Alguns estudos anteriores do nosso laboratório apontaram algumas similaridades e diferenças entre as linhagens SHR e SLA16. A linhagem SLA16 apresenta, em seu hipocampo, concentrações de DAT e D2 similares às da SHR, sugerindo, então, possuir a mesma hipofunção dopaminérgica (CORVINO, 2015). Além disso, a sua memória de trabalho se mostrou equivalente à da linhagem SHR (GRANZOTTO, 2016).

Entretanto, umas das vantagens é que essa linhagem exibe uma menor pressão arterial (CORRÊA, 2015) e um comportamento ainda mais ativo comparado com os SHR frente ao fator novidade (MEDEIROS et al., 2013; ANSELMINI et al., 2016). Esse interesse por novidade é denominado neofilia, uma das principais características presentes em humanos com TDAH, principalmente no subtipo hiperativo impulsivo (PARK et al., 2016). Juntas, essas características sugerem a linhagem SLA16 como um melhor modelo genético para o estudo de endofenótipos referentes a esse transtorno, do que os ratos SHR.

Um estudo realizado no nosso laboratório analisou alguns fatores de atenção e locomoção de fêmeas e machos SLA16 e SHR quando tratados cronicamente com

metilfenidato, um psicoestimulante bloqueador do DAT. Ele é o medicamento de primeira escolha para TDAH, pois quando utilizado cronicamente atenua os seus sintomas. O uso crônico em ratas e ratos SLA16 e SHR sugeriu que as fêmeas da linhagem isogênica possuem uma melhora na atenção na idade adulta, porém nenhuma alteração do perfil locomotor de nenhuma linhagem ou sexo. Enfatizando as fêmeas da linhagem SLA16 como possível modelo para estudo de atenção em TDAH (SQUARIZ, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

A baixa representatividade de fêmeas nos estudos com animais tem ganhado atenção nos últimos anos. Nos estudos biológicos, apenas 2 em cada 10, utilizam fêmeas em suas pesquisas. A neurobiologia é uma das áreas com menor inclusão, tendo apenas 9% dos seus estudos somente com fêmeas e, dos 25% que utilizam ambos os sexos, apenas 5% desses analisam as diferenças entre eles. Perante isso, em 2014, a National Institutes of Health (NIH) instituiu políticas encorajadoras a fim da utilização de animais de ambos os sexos nas pesquisas, considerando a diferença sexual como uma variável biológica (BEERY, 2018).

Os argumentos utilizados para justificar essa baixa adesão às fêmeas são: a maior variabilidade das fêmeas, principalmente pelo seu ciclo hormonal, a preocupação que a utilização de ambos os sexos aumente a dispersão de resultados e, assim, diminua o poder estatístico, e que a atenção para as diferenças entre os sexos, na fase pré-clínica, enfatize algo que clinicamente não tenha tanta significância ou, até mesmo não se reproduza (BEERY, 2018).

Contraopondo o primeiro argumento, análises empíricas mostraram que a variabilidade das fêmeas não é superior que a dos machos. Os métodos de análise fatorial, por sua vez, resultariam em uma baixa ou em nenhuma perda do poder estatístico, exceto quando há interação entre sexo e tratamento. Nesse caso seria necessário analisar ambos os sexos juntos e depois realizar um estudo específico para cada. Além disso, em questão de reprodutibilidade das diferenças sexuais de animais para humanos, são necessários estudos comparativos entre espécies e estudos correspondentes em humanos. Sempre lembrando que os estudos com roedores possuem limitações que devem ser observadas, não possibilitando uma translação tão direta e simplista. Todavia, não devemos subestimar esses estudos, uma vez que eles podem indicar a conservação e compartilhamento dos mecanismos subjacentes (BEERY, 2018).

Esse cenário se reproduz nas pesquisas relacionadas ao TDAH, apesar de algumas exceções já apontarem as ratas fêmeas como bom modelo de estudo, uma vez que apresentam vários endofenótipos com pouca ou nenhuma interferência relevante do seu ciclo hormonal. Um exemplo é o estudo realizado por Berger e Sagvolden (1998) com fêmeas e machos SHR e WKY, no qual ele indica que os machos SHR apresentam uma hiperatividade maior que as fêmeas, porém as

fêmeas SHR apresentam um déficit de atenção maior. Essas características fenotípicas encontradas condizem com as diferenças clínicas encontradas, onde o sexo masculino apresenta mais o transtorno tipo hiperativo e o sexo feminino, o tipo desatento.

Portanto, no presente estudo, pretende-se realizar uma análise comparativa entre as fêmeas das linhagens SHR e SLA16 para alguns endofenótipos do TDAH a fim de propor essas ratas como um importante modelo genético no estudo do TDAH.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar endofenótipos relacionados ao TDAH nas fêmeas das linhagens de ratos SHR e SLA16.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os perfis comportamentais das ratas SHR e SLA16 quando submetidas, repetidamente, a testes de emocionalidade.
- Analisar os perfis comportamentais das ratas SHR e SLA16 quando submetidas, repetidamente, a testes de atividade motora.
- Comparar os perfis comportamentais das duas linhagens entre si para propor o melhor modelo de avaliação de endofenótipos do TDAH.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas das linhagens SLA16 e SHR com, aproximadamente, 3 meses de idade, criadas no Laboratório de Genética do Comportamento. Os animais foram alojados em caixa-moradia coletivas (5 a 6 ratas por caixa), mantidos sob temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12h (luz das 7h às 19h), com água e comida *ad libitum*. Todos os experimentos deste trabalho seguiram as normas preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC), e foram aprovados sob o protocolo PP00903 (Anexo 1).

4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.2.1 Campo Aberto

O aparato do campo aberto consiste em uma caixa de madeira que possui uma arena preta fosca de 1 m² cercada por paredes brancas de 40 cm de altura (Figura 5). Os primeiros 10 cm² adjacentes às paredes constituem a área periférica e o quadrado central de 90 cm², a região central. A exposição do animal a um ambiente estranho, aberto e com luz permite avaliarmos o fator emocionalidade e a locomoção do animal. Com esse propósito, cada fêmea (7 de cada linhagem, com 10 semanas de idade) foi posicionada no centro do campo aberto e testada durante 1h, por 5 dias consecutivos. O teste foi filmado pelo sistema de câmeras posicionadas acima do aparato, e, posteriormente, analisado pelo *software* de rastreamento Anymaze® (Stoelting, USA).

Os parâmetros analisados foram: locomoção total, locomoção central, locomoção periférica, tempo de permanência no centro, porcentagem de locomoção central.

Figura 5 - Campo Aberto



Fonte: Medeiros (2012); Adaptado por Granzotto (2016).

4.2.2 Caixa de atividade

A caixa de atividade consiste numa caixa de madeira de 70 cm de comprimento por 23 cm de largura, com paredes de 22 cm de altura (Figura 6). Possui uma tampa de acrílico transparente e uma grade metálica no fundo. Há três sensores infravermelhos, distribuídos pela caixa, acoplados com um dispositivo contador. Esse contabiliza o número de vezes que o animal passou por cada sensor, mostrando imediatamente no seu visor digital. Por isso, o uso desse aparato tem como finalidade medir a atividade locomotora do animal em um ambiente muito parecido com sua caixa moradia.

A fim de comparar a atividade locomotora das linhagens SHR e SLA16, 8 fêmeas (12 semanas de idade) de cada linhagem, individualmente, foram expostas a caixa de atividade por um período de 1h, ao longo de 5 dias consecutivos.

Figura 6 - Caixa de Atividade



Fonte: Medeiros (2012).

4.2.3 Análises estatísticas

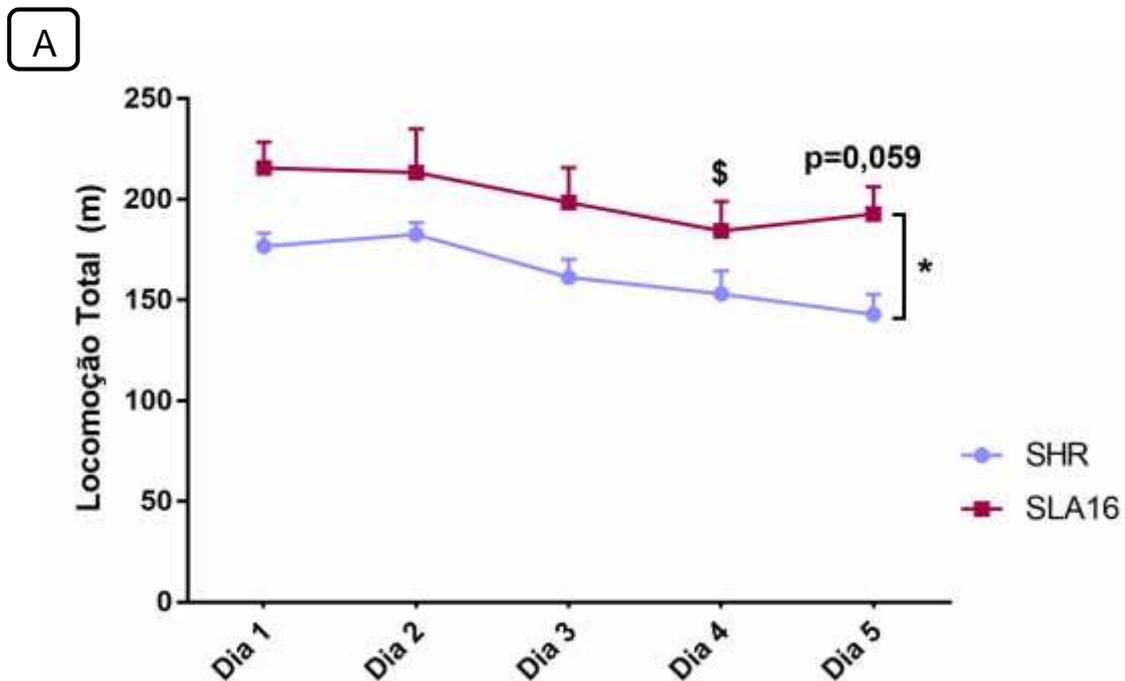
As análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistica®, versão 10 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (teste de Kolgomorov-smirnov) e à Análise de Variância (ANOVA). Utilizou-se uma ANOVA de medidas repetidas e, sempre que necessário, foi realizado o teste post hoc de Newman-Keuls. O nível de significância utilizado, em todo o trabalho, foi $p < 0,05$. Caso o valor de p fosse $0,01$ ou $0,001$, retratamos como sendo muito significativos e extremamente significativos, respectivamente.

5 RESULTADOS

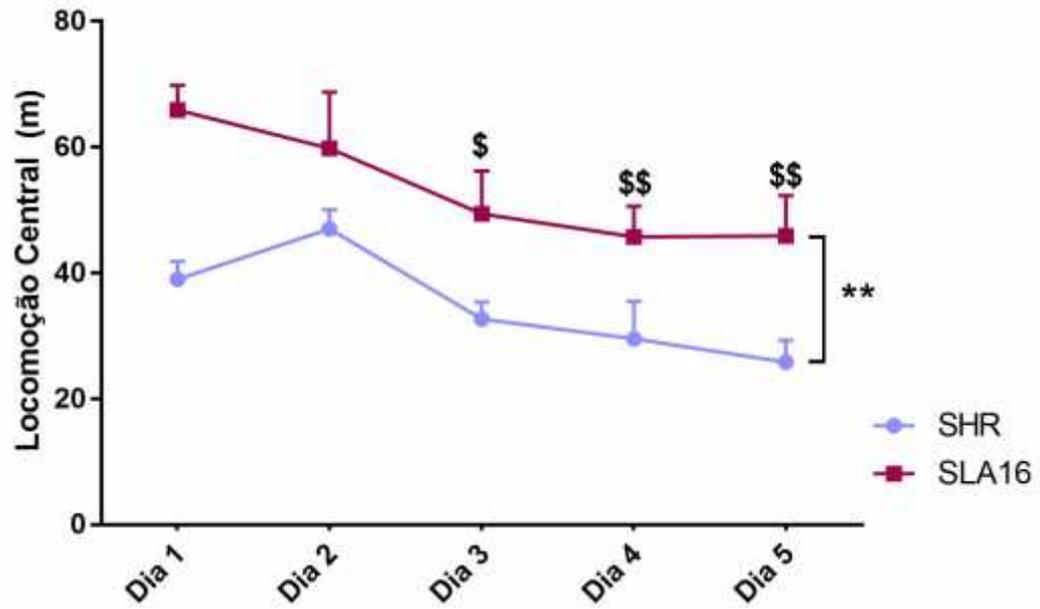
5.1 EXPERIMENTO 1: CAMPO ABERTO REPETIDO 1 HORA

Os dados do CA repetido por uma hora, durante cinco dias, mostraram um efeito do fator linhagem nos parâmetros: locomoção total [$F(1,12)=9,2943$, $p=0,01$, $SLA16>SHR$], locomoção central [$F(1,12)=13,523$, $p=0,003$, $SLA16>SHR$] (Figura 7). A única medida que não apresentou tal efeito foi a locomoção periférica [$F(1,12)=3,7708$, $p=0,07$, $SLA16>SHR$]. O fator repetição apresentou efeito significativo para locomoção total [$F(4,48)=3,5176$, $p=0,01$], locomoção central [$F(4,48)=7,2683$, $p=0,0001$] (Fig.1). Já para locomoção periférica, novamente, não demonstrou ser significativa [$F(4,48)=1,3278$, $p=0,27$]. Após realização do post-hoc de Newman-Keuls, constatou-se que ambas as linhagens apresentaram uma diminuição na locomoção no quarto dia. Todavia o perfil hiperlocomotor da linhagem SLA16, perante a SHR, permaneceu durante os 5 dias, mesmo com uma pequena habituação.

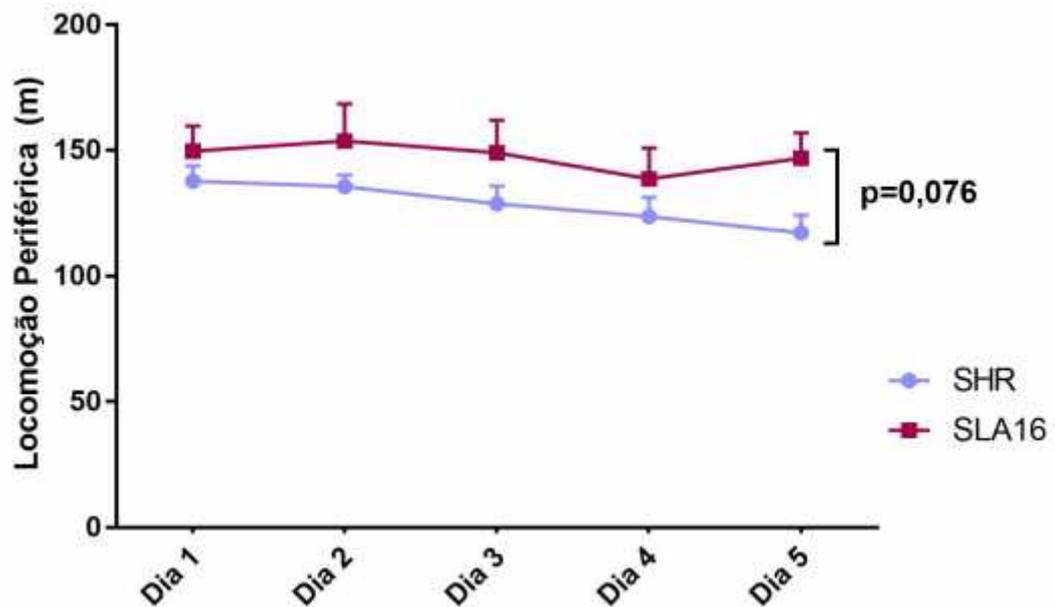
Figura 7- Distância total, periférica e central percorridas no CA



B



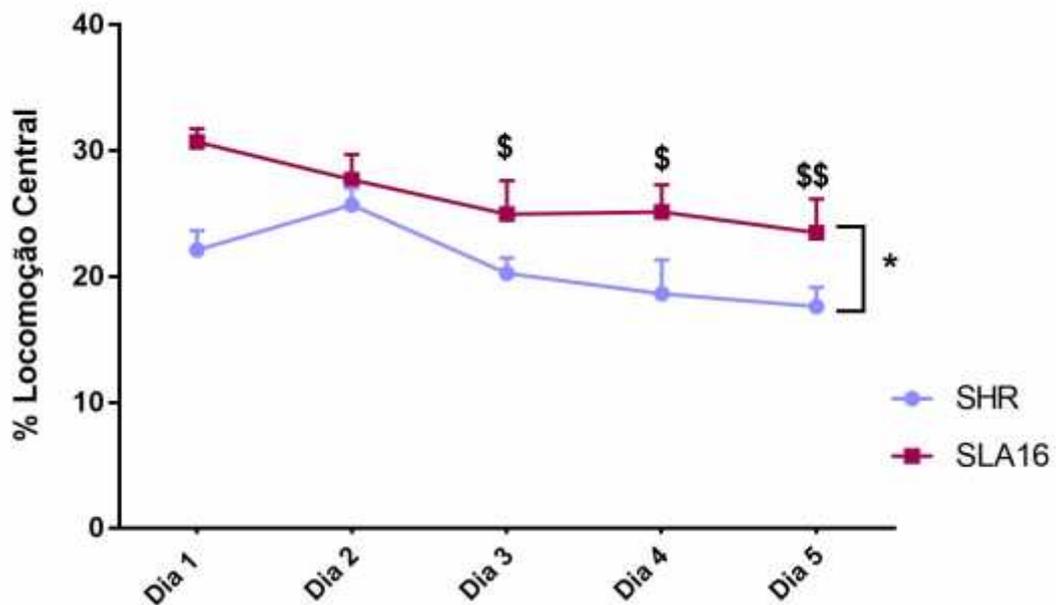
C



Resultados expressos em médias \pm E. P. M. Efeito linhagem: (A) * p 0,05, (B) p=0,076 e (B) ** p 0,01, comparado as linhagens SLA16 e SHR. Efeito repetição: (A) \$ p 0,05 e p= 0,059 comparado com o primeiro e segundo dia, (B) \$ p 0,05 e \$\$ p 0,01 comparado com o primeiro dia.

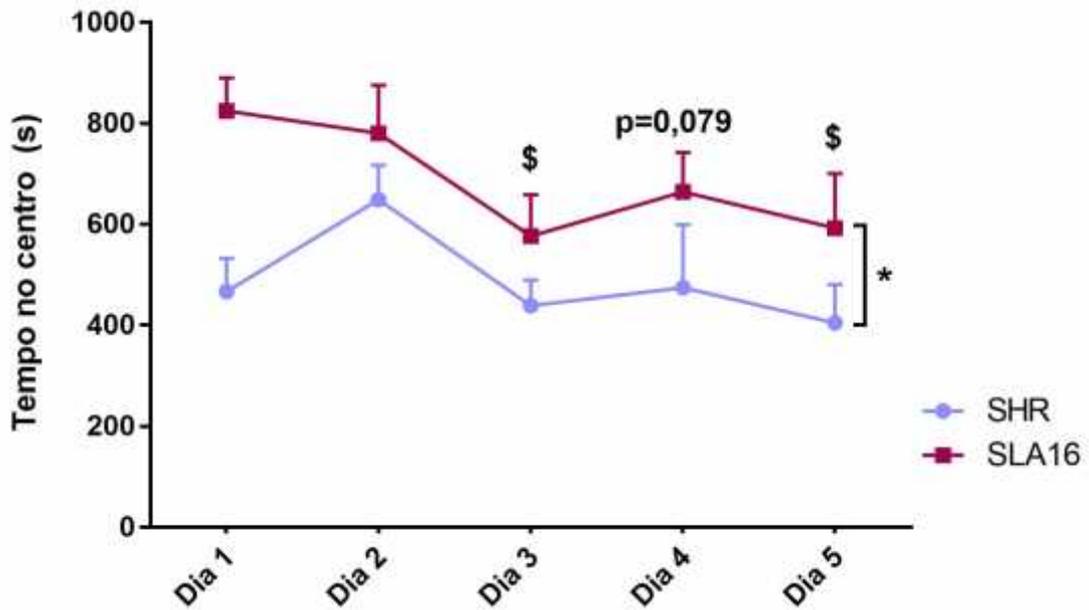
A ANOVA de medidas repetidas constatou que perante a área central do aparato, considerada a região aversiva, houve um efeito do fator de linhagem para os parâmetros de porcentagem de locomoção central [F(1,12)=7,3174, p=0,02 SLA16>SHR] (Figura 8) e tempo de permanência no centro [F(1,12)=5,5758, p=0,03, SLA16>SHR] (Figura 9). Além disso, o fator repetição exibiu um efeito significativo tanto para porcentagem de locomoção central [F(4,48)=6,7028, p=0,0002], como para tempo de permanência no centro [F(4,48)=3,9541, p=0,007]. Com o post-hoc de Newman-Keuls percebemos que houve uma diminuição da porcentagem de locomoção central e do tempo no centro das duas linhagens a partir do terceiro dia, o que corrobora com a habituação constatada anteriormente.

Figura 8 - Porcentagem de locomoção central no CA



Resultados expressos em médias \pm E. P. M. Efeito linhagem: * p 0,05 comparado as linhagens SLA16 e SHR. Efeito repetição: \$ p 0,05 e \$\$ p 0,01 comparado com o primeiro e o segundo dia.

Figura 9 - Tempo de permanência no centro do CA

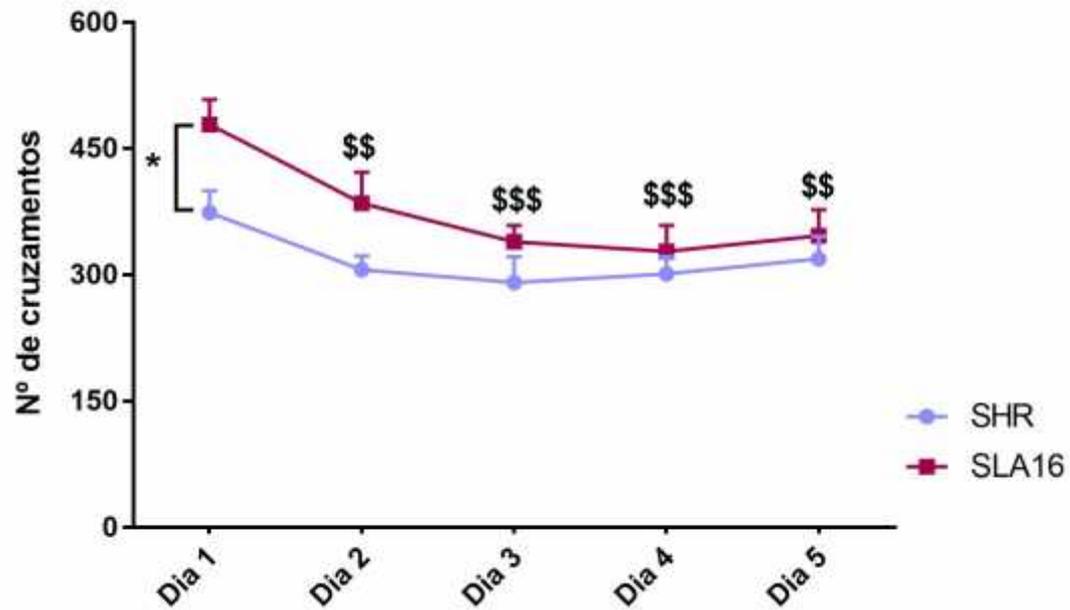


Resultados expressos em médias \pm E. P. M. Efeito linhagem: * $p < 0,05$ comparado as linhagens SLA16 e SHR. Efeito repetição: \$ $p < 0,05$ e $p=0,079$ comparado com o segundo dia.

5.2 EXPERIMENTO 2: CAIXA DE ATIVIDADE REPETIDO 1 HORA

No segundo experimento, os animais foram expostos a CA_{ativ} por cinco dias, durante uma hora diária. Esse protocolo revelou um efeito linhagem no número de cruzamentos [$F(1,14) = 5,9700$, $p=0,02$], tendo a linhagem SLA16 se locomovido mais que a SHR. Além disso, percebeu-se um efeito de repetição [$F(4,56) = 6,9904$, $p=0,0001$], sugerindo que houve uma habituação de ambas as linhagens. Após a realização do post-hoc de Newman-Keuls, observamos que todos os dias se diferem do primeiro, afirmando a habituação sugerida (Figura 10).

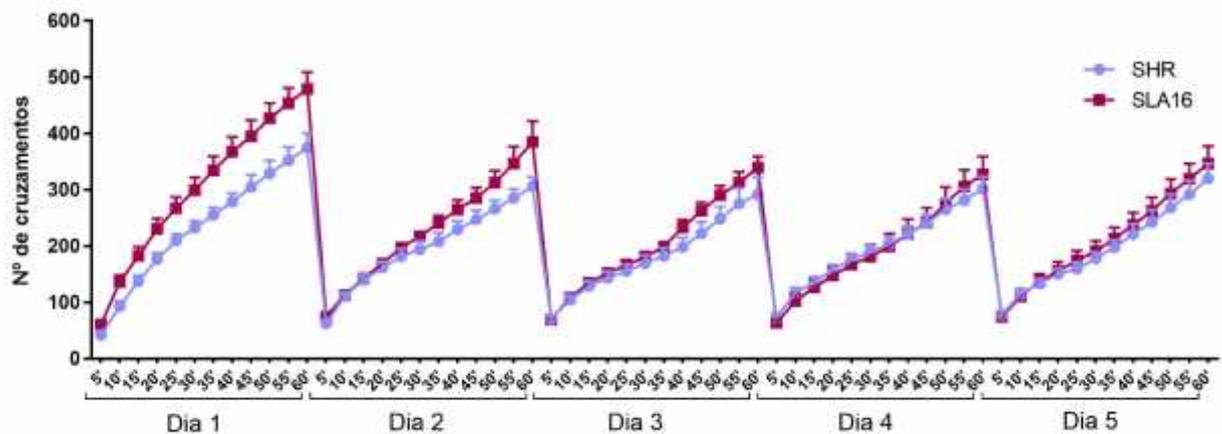
Figura 10 - Locomoção total na CATiv



Resultados expressos em médias \pm E. P. M. Efeito linhagem: * p 0,05 comparado as linhagens SLA16 e SHR. Efeito repetição: \$\$ p 0,01 e \$\$\$ p 0,001, comparado com o primeiro dia.

Com as curvas diárias das duas linhagens percebe-se que seus perfis comportamentais se tornam mais semelhantes com o decorrer dos cinco dias (Figura 11).

Figura 11 - Número de cruzamentos a cada 5 minutos na CATiv



6 DISCUSSÃO

O TDAH é o transtorno neuropsiquiátrico mais comum na infância e adolescência. No qual, a deficiência de dopamina e/ou noradrenalina na fenda sináptica ocasiona uma tríade sintomatológica de hiperatividade, impulsividade e falta de atenção, os quais acarretam, entre outras coisas, uma dificuldade em aprendizado. A maior parte da literatura desse transtorno esta direcionada ao sexo masculino, Bloom (2012) justifica essa predileção em virtude da taxa de diagnóstico ser maior em homens do que em mulheres. Essa diferença numérica de diagnósticos se origina provavelmente nos diferentes perfis que cada sexo apresenta do transtorno, tendo os meninos um perfil hiperativo, facilmente diagnosticado em questionários de avaliação e a as meninas o perfil desatento, muito menos evidente (BEATRIZ, 2006).

O diagnóstico e o tratamento do TDAH em mulheres, provavelmente nos próximos anos, aumentará os estudos relacionados às diferenças entre os sexos e reconhecerá a importância da utilização das fêmeas na pesquisa científica. Em estudos realizados no nosso laboratório, algumas dessas diferenças já foram constatadas. Dentre elas, destaca se o alto perfil locomotor observado desde a criação da linhagem isogênica (MEDEIROS et al., 2013; ANSELMINI et al., 2016; GRANZOTTO, 2016) e a melhora na memória de trabalho observada apenas em fêmeas SLA16, após o tratamento com metilfenidato (Ritalina®) (SQUARIZ, 2018). Dessa maneira, a fim de elucidar o comportamento das fêmeas SLA16 e propor essa linhagem como um modelo de estudo para alguns endofenótipos relacionados ao TDAH, realizou-se dois testes distintos: CA e CATid. Ambos os protocolos foram de 5 dias consecutivos com duração de 1 hora/dia.

O campo aberto é o aparato mais utilizado para identificar índices de locomoção e emocionalidade em roedores (PRUT & BELZUNG, 2003). Dispondo os animais em uma situação de confronto entre: permanecer perto das paredes, a área segura, ou explorar o centro, a área desconhecida (fator novidade). Dessa maneira, a locomoção periférica e a locomoção central tradicionalmente avaliam componentes emocionais diferentes: a primeira, índices locomotores, e a segunda, parâmetros de ansiedade. Porém, diversos autores sugerem que medidas ditas locomotoras também são influenciadas pela ansiedade e vice versa (MORMEDE et al., 2002; ROY et al., 2009), uma vez que os testes de comportamento exploratório, como o

caso do CA, não permitiriam uma dissociação entre o comportamento movido por um fator locomotor e o movido por um fator emocional.

Um parâmetro que tenta atenuar a influência do fator locomotor é a porcentagem de locomoção central. A qual, neste trabalho, demonstrou se significativamente maior, juntamente com o tempo de permanência no centro, para as fêmeas SLA16. Dessa maneira, inferimos que essa linhagem demonstra ter um comportamento tipo-ansioso ainda menor que a linhagem SHR, considerada como uma linhagem de baixa ansiedade experimental (SAGVOLDEN, 2005). Além disso, o parâmetro da locomoção total evidenciou o perfil locomotor superior das ratas SLA16 em relação ao da linhagem SHR, já constatado em outros trabalhos desse laboratório (ANSELMINI et al., 2016; SQUARIZ, 2018). Isso demonstra que o *locus* diferencial influencia tanto a atividade locomotora como a emocionalidade (MEDEIROS et al., 2013) e sugere que essa região cromossômica possui genes importantes para o estudo de características emocionais.

Observamos também uma diminuição na locomoção de ambas as linhagens no decorrer dos cinco dias, essa habituação é um indicativo de aprendizado (THIEL et al., 1998). Todavia, quando comparamos com os dados da literatura, essa habituação é muito mais acentuada em outras linhagens de roedores, como, por exemplo, os Wistar Kyoto (WKY), controle genético da linhagem SHR (SAGVOLDEN, 2005). Isso sugere que a linhagem SLA16 possui uma dificuldade de aprendizado, pelo menos igual à linhagem SHR. A fim de confirmar essa teoria se torna necessário a realização de mais testes, os quais tenham um maior enfoque na aprendizagem. Contudo, isso condiz com as características do TDAH.

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V, as pessoas com TDAH devem apresentar os sintomas em mais de um ambiente (ex: casa e escola) e suas características variam de acordo com o local. Além disso, suas manifestações podem diminuir ou até mesmo ausentar quando expostas a uma situação nova, quando recebem alguma recompensa ou se estão sendo supervisionados (DSM-V, 2013).

Desse modo, realizamos o teste em dois ambientes com características distintas. Enquanto o CA possui uma região aversiva e proporciona o fator novidade, a CA_{ativ} se assemelha com a caixa moradia, provocando pouco estímulo desafiador ao animal. Contudo, obtivemos neste segundo aparato os resultados já apresentados no primeiro, ou seja, diferença no fator linhagem e no fator repetição.

Com isso chegamos à conclusão que as fêmeas SLA16 são mais hiperativas que as SHR sob o fator novidade, ou não, e que ambas as linhagens demonstram uma certa habituação locomotora, que é mais pronunciada na CAtiv. Ou seja, se compararmos o fator repetição do CA com o da CAtiv, notaremos que no segundo ele foi mais significativo. Isso indica que a redução da locomoção das linhagens é maior e ocorre antes em um aparato que apresenta menos desafios, como a CAtiv, do que em um aparato mais desafiador, como o CA. A curva detalhada de 5 em 5 minutos (Figura 11) expõe essa redução no perfil locomotor das duas linhagens, principalmente por parte da linhagem SLA16. Todavia essa permanece até no quinto dia com uma maior locomoção que a SHR. O que corrobora com o perfil mais hiperativo da linhagem SLA16, sugerindo essa linhagem um bom modelo para o estudo de endofenótipos do TDAH.

Granzotto (2016) realizou os mesmos protocolos presentes neste trabalho, porém com machos das linhagens SLA16 e SHR. Os resultados obtidos com os machos no CA se assemelharam com os das fêmeas no quesito porcentagem de locomoção central, tendo, também, a linhagem SLA16 como um modelo menos ansioso. Entretanto, no quesito locomoção total os resultados divergem, uma vez que os machos não demonstram diferença locomotora entre as linhagens e as fêmeas sim.

Além disso, há uma discrepância eminente entre os escores de locomoção de machos e fêmeas, tanto para linhagem SLA16 como para SHR, o que condiz com outros trabalhos do laboratório (ANSELMINI, 2016; ACUÑA, 2015). Enquanto os machos SHR percorrem entre 100 a 150 metros do primeiro ao quinto dia, as fêmeas percorrem de 150 a 200 metros. Já para a linhagem SLA16 essa diferença é ainda maior, tendo os machos se locomovido 100 a 150 metros e as fêmeas 180 a 210 metros. Ou seja, mesmo no dia em que as fêmeas caminham menos, elas caminham em torno de 30% a mais do que no dia que os machos se locomovem mais. Dados na literatura revelam que essa diferença sexual nos níveis de atividade pode ir de 20% a mais de 50% em roedores, tendo sempre o sexo feminino uma maior atividade que o sexo masculino (LIGHTFOOT, 2008).

Essa diferença não é uma novidade visto que diversas pesquisas com ratos e camundongos já apontaram um comportamento menos defensivo por parte das fêmeas em comparação aos machos (ADAMEC et al., 2006). Devido elas explorarem mais os lugares aversivos dos aparatos, como por exemplo: o centro do

CA (KENNET et al, 1986), a parte clara da Caixa Branca e Preta (CBP) (ADAMEC et al., 2006; VOIKAR et al., 2001) e os braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado (JOHNSTON; FILE, 1991; RODGERS; COLE, 1993; BOWMAN; ZRULL; LUINE, 2001). Um trabalho recente do nosso laboratório encontrou esses mesmos resultados para os três testes citados acima com as linhagens aqui estudadas. Tendo ainda apontado um escore superior, do que qualquer outro grupo, das fêmeas SLA16 para os dois primeiros testes (ACUÑA, 2015).

A explicação dada por alguns pesquisadores para esse tipo de comportamento das fêmeas é devido aos hormônios sexuais, principalmente o estrogênio. Esse hormônio ao se ligar ao seu receptor alfa se tornaria um mediador primário para o aumento locomotor das ratas, porém o funcionamento desse mecanismo ainda não está muito claro (GAREY, 2001). Alguns observaram que o estrogênio regula diferentes etapas do sistema dopaminérgico (transportador, receptores pré e pós-sinápticos e metabolismo), ocasionando um aumento de dopamina (LIGHTFOOT, 2008). Já uma pesquisa realizada com fêmeas ovariectomizadas mostrou que quando essas recebem tratamento com estrógeno, elas passam a entrar mais no centro do CA e nos braços abertos do LCE (WALF; FRYE, 2005, LUINE et al., 2007). Contudo, esse hormônio poderia influenciar o perfil locomotor e emocional das ratas.

Outras hipóteses tentam explicar a razão dessa diferença entre sexos. Horst (2012) sugere que as diferenças comportamentais apresentadas são devidas à desigualdade da reatividade do eixo HPA (Hipotálamo-Hipófise-Adrenal). Por exemplo, as fêmeas apresentam níveis basais de corticosterona superiores aos dos machos (FIGUEIREDO et al., 2002). Andersen e Teicher (2000) sugerem que a maior produção e eliminação dos receptores dopaminérgicos nos meninos explicaria a maior incidência do tipo hiperativo nesse gênero, e que a lenta eliminação desses receptores por parte feminina corroboraria com a maior persistência dos sintomas em mulheres na fase adulta.

Ao comparamos os resultados obtidos na CAtiv com os apresentados por Granzotto (2016), constatou se que os sexos dos animais inferiram em comportamentos antagônicos. Na linhagem SLA16, os espécimes femininos possuíram uma atividade superior, e os masculinos uma atividade inferior, em comparação ao seu respectivo sexo da linhagem SHR. Isso sugere que as fêmeas SLA16 apresentam um perfil hiperativo ainda maior que os machos, diferente do

perfil clínico de humanos, onde os homens com TDAH tendem a apresentar um perfil mais impulsivo/hiperativo e as mulheres um perfil mais desatento (DMS-V, 2013). Essa divergência de perfis entre animais e humanos também foi constatada na linhagem SHR por Bayless, Perez e Daniel (2015), os quais ao compararem machos e fêmeas das linhagens SHR e WHY para diferentes testes de locomoção, atenção e aprendizado, notaram que as fêmeas SHR possuem hiperatividade, porém não expressam um déficit de atenção.

Entretanto alguns estudos do nosso laboratório já demonstraram que as fêmeas podem ter um prejuízo de memória/aprendizado. Anselmi (2016), ao realizar o teste do Labirinto em Cruz Elevado Modificado (LCEM) notou que as fêmeas de ambas as linhagens tiveram um aumento no percentual de entrada no braço aversivo na sessão teste em relação à sessão treino. Esse aparato além de possuir o braço aberto (região “fator novidade” clássica do LCE), contem também um braço fechado acoplado a uma lâmpada e um aparelho que emite som, o que o torna aversivo (ANSELMÍ, 2016). Dessa maneira, o LCEM analisa emocionalidade (exploração do braço aberto) e memória/aprendizado (exploração do braço aversivo) (RIBEIRO et al., 2010). Contudo, a ocorrência de uma maior exploração do braço aversivo após o treino, indicaria que as fêmeas não conseguem recordar de memórias aversivas (som e luz) (ANSELMÍ, 2016).

Acuña (2015) retratou em seu trabalho que as fêmeas SLA16 em um estado sem droga foram as únicas do grupo (fêmeas e machos SHR e SLA16) a não apresentarem o fenômeno de tolerância a primeira exposição (do inglês *One Trial Tolerance*) ao LCE. Esse fenômeno é caracterizado por uma significativa redução dos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos no LCE, após os animais já terem sido expostos uma vez a esse aparato (FRUSSA-FILHO et al., 1999). A autora sugeriu que o *locus* diferencial entre as linhagens pode estar interferindo no processo de memória/aprendizado, uma vez que quando causados administrados doses de amnésicas de fármacos antes do teste, se evita o aparecimento desse fenômeno (BERTOGLIO E CAROBREZ, 2004; STERN et al., 2008).

Squariz (2018) propôs que as fêmeas SLA16 seriam um modelo interessante para o estudo de processos relacionados à atenção e a memória no TDAH, em razão delas, após 1 mês do tratamento crônico com metilfenidato, terem apresentado uma melhora na discriminação de novos objetos. Evolução essa que só aconteceu após 4 meses nas fêmeas SHR e, em nenhum dos períodos, mostrou-se

presente nos machos dessas linhagens. Essa maior sensibilização das fêmeas corrobora com a diferença clínica na resposta feminina e masculina ao tratamento com psicoestimulantes (WALKER *et al.*, 2001; CARRIER & KABBAI, 2012; CHELARU *et al.*, 2012; VAN SWEARINGEN *et al.*, 2013).

Como já mencionado as duas linhagens deste trabalho só se diferenciam no *locus* do cromossomo 4, logo as diferenças comportamentais ou de sensibilidade a fármacos apresentadas podem ser atribuídas a essa região diferencial. Dentro dessa, há diversos genes candidatos a serem estudados, porém devido a sua relação com o sistema dopaminérgico e aos QTLs identificados, os quais influenciam no “tempo no centro” e na “tentativa de escape”, estarem próximas a posição do gene *Snca* da alfa-sinucleína, ele se tornou um dos fortes candidatos a serem estudados (ANSELMINI, 2016; CHIAVEGATTO *et al.*, 2009). Anselmi (2016) apontou uma maior expressão de RNAm da alfa-sinucleína no hipocampo e estriado da linhagem mais ansiosa (SHR>SLA16), assim como Chiavegatto e colaboradores (2009) haviam encontrado no hipocampo da linhagem LEWS uma quantidade superior à da SHR.

Essas diferenças enfatizam a necessidade da inserção das fêmeas na pesquisa científica para assim elucidar melhor tanto os mecanismos afetados em cada gênero pelo TDAH, como as respostas comportamentais apresentadas por esses na utilização de psicoestimulantes. A razão dessa diferença entre os sexos é um ponto que deve ser investigado futuramente, tendo como perspectivas futuras uma análise mais aprofundada da memória das ratas e a interferência hormonal no comportamento, principalmente o estrogênio.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que as fêmeas da linhagem SLA16 apresentam uma locomoção superior as da linhagem SHR, tanto em ambientes desafiadores, como o campo aberto, como em ambientes mais semelhantes a sua moradia, como a caixa de atividade. Observamos uma habituação de ambas às linhagens aos aparatos. Porém, mesmo com essa habituação as ratas SLA16 se mostraram mais hiperativas que a outra linhagem e, até mesmo, os machos SLA16. Destacamos, assim, a importância da inserção das fêmeas nas pesquisas TDAH.

Outro resultado importante deste trabalho foi que as ratas SLA16 exploram mais as regiões aversivas do campo aberto de uma maneira consistente e repetida, portanto são menos ansiosas que a linhagem SHR. Constatando que o *locus* diferencial exerce influência tanto para parâmetros locomotores como emocionais.

Então, confirmamos a hipótese de que a linhagem SLA16 pode ser um modelo melhor para os estudos pré-clínicos para alguns endofenótipos do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade.

Deixamos como sugestão para estudos futuros análise de parâmetros referentes à memória/aprendizado e hormonais, principalmente o estrogênio, em fêmeas. Além disso, uma análise com animais de diferentes idades de ambos os sexos, a fim de analisar se acontece alguma mudança comportamental e se a persistência clínica de perfis desatentos realmente é superior ao hiperativo na vida adulta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, L. R. **Investigação do fenômeno de tolerância à primeira exposição (one-trial tolerance) utilizando uma linhagem congênica de ratos (SLA16) e seu controle isogênico SHR.** 2015. 88f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2015.

ADAMEC, R.; HEAD, D.; BLUNDELL, J.; BURTON, P.; BERTON, O. Lasting anxiogenic effects of feline predator stress in mice: sex differences in vulnerability to stress and predicting severity of anxiogenic response from the stress experience. **Physiol Behav.** 88.1– 2:12–29. 2006.

ANDERSEN, S.I.; TEICHER, M.h.. Sex differences in dopamine receptors and their relevance to ADHD. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.137-141, jan. 2000. Elsevier BV.

ANDRADE, Cristiane Ruth Mendonça de et al. Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). **Revista Medicina Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 4, n. 21, p.455-464, fev. 2011.

ANSELMÍ, Mayara. **O cromossomo 4 contém regiões genômicas que influenciam a memória e a emocionalidade em fêmeas.** 2016. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

ANSELMÍ, M.; CORREA, F.J. et al. Genetic evidence for chromosome 4 loci influencing learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 131, p. 182–191, 2016.

BAYLESS, Daniel W.; PEREZ, Maria C.; DANIEL, Jill M.. Comparison of the validity of the use of the spontaneously hypertensive rat as a model of attention deficit hyperactivity disorder in males and females. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 286, p.85-92, jun. 2015. Elsevier BV.

BEATRIZ, Katia. **TDAH EM MENINAS E MULHERES.** 2006. Publicado pela ABDA. Disponível em: <<https://tdah.org.br/tdah-em-mulheres/>>. Acesso em: 14 maio 2016.

BEERY, Annaliese K.. Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. **Current Opinion In Behavioral Sciences**, [s.l.], v. 23, p.143-149, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.06.016>.

BEIERWALTES, W.H.; ARENDSHORST, W.J.; KLEMMER, P.J. Electrolyte and Water Balance in Young Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 4, n. 6, p. 908-915, 1982.

BERGER, David F.; SAGVOLDEN, Terje. Sex differences in operant discrimination behaviour in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioural**

Brain Research, [s.l.], v. 94, n. 1, p.73-82, jul. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-4328\(97\)00171-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-4328(97)00171-x).

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. **Behavioural Pharmacology**. v.15 (1), p.45-54, 2004.

BIEDERMAN, J., SPENCER, T. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 1234-1242, 1999.

BLOOM, B.; COHEN, R. A.; FREEMAN, G. Freeman G. Summary health statistics for U.S. children: National Health Interview Survey, 2011. **Vital and Health Statistics**, v.10p.1–80, 2012.

BOWMAN, R. E.; ZRULL, M. C.; LUINE, V. N. Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats. **Brain Res.** 904(2):279–289. 2001.

BRESSAN, RA; CRIPPA JA.The role of dopamine in reward and pleasure behaviour-
-review of data from preclinical research. **Acta Psychiatrica Scandinavica**. v. 427; p. 14-21, 2005.

BRYDA, E. The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. **Missouri Medicine**, v.110, n. 3, p. 207-210, 2013.

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

CARLEZON, WA Jr; THOMAS, MJ. Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. **Neuropharmacology**. v. 56; p. 122-132, 2009.

CARRIER, N.; KABBAJ, M. Sex differences in social interaction behaviors in rats are mediated by extracellular signal-regulated kinase 2 expression in the medial prefrontal cortex. **Neuroscience**, v.212, p.86–92, 2012.

CHELARU, M. I.; YANG, P. B.; DAFNY, N. Sex differences in the behavioral response to methylphenidate in three adolescent rat strains (WKY, SHR, SD). **Behavioural Brain Research**, v. 226, p. 8–17, 2012.

CHIAVEGATTO, S. et al. Expression of a-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. **Molecular Psychiatry**, v. 14, p. 894–905, 2009.

CHIAVEGATTO, S.; IZÍDIO, G. S.; MENDES-LANA, A.; ANEAS, I.; FREITAS, T. A.; TORRÃO, A. S.; CONCEIÇÃO, I. M.; BRITTO, L.R. G.; RAMOS, A. Expression of a-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. **Molecular Psychiatry**, v. 14, p. 894-905. 2009.

COUTO, Taciana de Souza; MELO-JUNIOR, Mario Ribeiro de; GOMES, Cláudia Roberta de Araújo. Aspectos neurobiológicos do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH): uma revisão. **Ciências & Cognição**, Recife, v. 15, n. 1, p.241-251, 20 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.cienciasecognicao.org>>. Acesso em: 20 abr. 2010.

CORRÊA, Fernanda Junkes. **O cromossomo 4 influencia comportamentos relacionados à memória em um modelo genético de ratos**. 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CORVINO, María Elisa. **Investigação da participação do receptor dopaminérgico D2 nas diferenças comportamentais, relacionadas à ansiedade/emocionalidade, das linhagens SHR e SLA16**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DAVIDS, E. et al. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Brain Research Reviews**, v. 42, p. 1–21, 2003.

Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. — 5th ed. American Psychiatric Association, 2013.

ERNST, M.; LUCIANA, M. Neuroimaging of the Dopamine/Reward System in Adolescent Drug Use. **CNS Spectrums**, v. 20, n. 4, p. 427–441, 2015.

FAGUNDES DJ, TAHA MO. **Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente**. Acta Cir Bras [serial online] 2004 Jan-Fev;19(1). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

FARAONE, S.V.; BIEDERMAN, J. What is the prevalence of adult ADHD? Results of a population screen of 966 adults. **Journal of Attention Disorder**, v. 9, n. 2, p. 384-91, 2005.

FIGUEIREDO, H. F.; DOLGAS, C. M.; HERMAN, J. P. Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus. **Endocrinology**. 143(7):2534–2540. 2002.

FLORESCO, SB; MAGYAR, O. Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. **Psychopharmacology**, v. 188, n. 4 p. 567-585, 2006.

FRUSSA-FILHO, R.; BARBOSA-JUNIOR, H.; SILVA, R. H.; DA, C.C.; MELLO, C. F. Naltrexone potentiates the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in rats exposed to novel environments. **Psychopharmacology**. (Berl.) 147, 168–173. 1999.

GAREY, J. et al. Effects of the phytoestrogen coumestrol on locomotor and fear-related behaviors in female mice. **Hormones And Behavior**. [s.i], p. 65-76. 2001.

GREVET, Eugenio H. et al. Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **European Archives Of Psychiatry And Clinical Neuroscience**, [s.i], v. 5, n. 256, p.311-319, 5 maio 2006.

GRANZOTTO, Natalli. **Efeitos farmacogenéticos do tratamento com cafeína em ratos isogênicos SHR e SLA16**. 2016. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

HORST, J. P.; KLOET, E. R.; SCHÄCHINGER, H. Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition. **Cell Mol Neurobiol**. 32:725–735. 2012.

JACOB, HJ. The Rat: A Model Used in Biomedical Research. **Methods in Molecular Biology**, v. 597, p. 1-11, 2010.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiol Behav**. 49(2):245–250. 1991.

KENNETT, G. A.; CHAOULOFF, F.; MARCOU, M.; CURZON, G. Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: the possible role of serotonin. **Brain Res**. 382(2):416–421.1986.

KESSLER, Ronald C. et al. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: Results from the National Comorbidity Survey Replication. **American Journal Psychiatry**. [s.i], p. 716-723. abr. 2016.

LIGHTFOOT, J. Timothy. Sex Hormones' Regulation of Rodent Physical Activity: A Review. **International Journal Of Biological Sciences**. [s.i], p. 126-132. 29 abr. 2008.

LUINE, V. N.; BECK, K. D.; BOWMAN, R. E.; FRANKFURT, M.; MACCLUSKY, N. J. "Chronic Stress and Neural Function: Accounting for Sex and Age". **Journal of Neuroendocrinology**. 19, 743–751. 2007.

MAJDAK, P.; OSSYRA, J.R.; OSSYRA, J. M.; COBERT, A.J. et al. A new mouse model of ADHD for medication development. **Nature research journal**. n.6, p.39472, 2016.

MEDEIROS, Gabriela Ferreira de. **Caracterização fenotípica e molecular da linhagem congênica de ratos shr.lew-anxrr16 como um novo modelo genético para o estudo da ansiedade**. 2012. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MEDEIROS, Gabriela Ferreira de et al. Low-Anxiety Rat Phenotypes Can Be Further Reduced through Genetic Intervention. **Plos One**. [s.i], p. 1-12. 30 dez. 2013.

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

MORMÈDE, P.; MONEVA, E.; BRUNEVAL, C.; CHAOULOFF, F.; MOISAN, M., -P. Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. **Genes, Brain and Behavior**, v. 1, n. 2, p. 111-116. 2002.

OHAN, Jeneva L.; VISSER, Troy A. W.. Why Is There a Gender Gap in Children Presenting for Attention Deficit/Hyperactivity Disorder Services? **Journal Of Clinical Child & Adolescent Psychology**. [s.i], p. 650-660. 4 set. 2009.

PARK, H. et al. Temperament and characteristics related to attention deficit/hyperactivity disorder symptoms. **Comprehensive Psychiatry**, v.70, p.112-117, 2016.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v.28, n.1-3, p.3-33, 2003.

POLANCZYK, G. et al. The Worldwide Prevalence of ADHD: A Systematic Review and Metaregression Analysis. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, p. 942–948, 2007.

QUINN, Patricia O. Treating Adolescent Girls and Women With ADHD: Gender-Specific Issues. **J Clin Psychiatry**. [s.i], p. 579-587. 2005.

QUINN, Patricia; WIGAL, Sharon. Perceptions of Girls and ADHD: Results From a National Survey. **Medgenmed: Medscape general medicine**. 5 maio 2004.

QUINN PO, MADHOO M. A review of attention-deficit/hyperactivity disorder in women and girls: uncovering this hidden diagnosis. **Prim Care Companion CNS Disord**. 2014

RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v.85, n.1, p.57-69, 1997.

RAMOS, A.; MORMEDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 1, p. 33-57. 1998.

RIBEIRO, A. M. et al. Brain and Cognition Sex differences in aversive memory in rats: Possible role of extinction and reactive emotional factors. **Brain and Cognition**, v. 74, n. 2, p. 145–151, 2010.

RJ, Robison et al. Gender differences in 2 clinical trials of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: a retrospective data analysis. **J Clin Psychiatry**. [s.i], p. 213-221. fev. 2008.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. **Physiol Behav**. 54(4):729–736. 1993.

ROHDE, Luis A.; HALPERN, Ricardo. Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: atualização. **Jornal de Pediatria**. Rio de Janeiro, p. 61-70. 2004.

ROMANOS, M. Structural abnormality of the substantia nigra in children with attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal Psychiatry Neuroscience**, v. 35, n. 1 p. 55-58, 2010.

ROY, V. et al. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: Evidence for new behavioral interpretations during test and retest. **Psychopharmacology**, v. 203, n. 1, p. 131–141, 2009.

RUSSELL, V. et al. Differences between electrically-, ritalin- and D-amphetamine-stimulated release of [3H]dopamine from brain slices suggest impaired vesicular storage of dopamine in an animal model of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 94, p. 163–171, 1998.

RUSSELL, V. et al. Methylphenidate affects striatal dopamine differently in an animal model for attention-deficit/hyperactivity disorder— The spontaneously hypertensive rat. **Brain Research Bulletin**, v. 53, n. 2, p. 187–192, 2000.

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

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

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

SAGVOLDEN, T.; METZGER, M.A.; SCHIORBECK, H.K.; RUGLAND, A.L.; SPINNANGR, L.; SAGVOLDEN, G. The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of childhood hyperactivity (ADHD): changed reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants. **Behavioral and Neural Biology**, v.58, p.103–112, 1992.

SANTOS, Letícia de Faria; VASCONCELOS, Laércia Abreu. Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade em Crianças: Uma Revisão Interdisciplinar. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, [s.i.], v. 26, n. 4, p.717-724, out. 2010.

SEEMAN, P., MADRAS, B.K. Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and 23 amphetamine. **Molecular Psychiatry**, v.3, p.386-396, 1998.

SQUARIZ, Jéssica Cordeiro de Oliveira. **Investigação dos efeitos do metilfenidato em um modelo genético relacionado a endofenótipos do TDAH**. 2018. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

STANDAERT, David G.; GALANTER, Joshua M. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In: GOLAN, David E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 12. p. 166-185.

STERN, C. A. J.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic- like effect in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 90: 545–550. 2008.

SWANSON, J M et al. Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *The Lancet*, Reino Unido, v. 351, p.429-433, 7 fev. 1998.

THIEL, C.M.; HUSTON, J.P.; SCHWARTING, R.K.W. Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience*, v. 85, n. 4, p. 1253-1262, 1998.

TRIPP G.; WICKENS J.R. Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology*, v. 57, p. 579-89, 2009.

VAN SWEARINGEN, A. E.; WALKER, Q. D; KUHN, C. M. Sex differences in novelty- and psychostimulant-induced behaviors of C57BL/6 mice. *Psychopharmacology*, v.225,p.707–718, 2013.

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

VOIKAR, V.; KOKS, S.; VASAR, E.; RAUVALA, H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav.*72(1–2):271–281. 2001.

WAITE, Roberta. Women and attention deficit disorders: A great burden overlooked. *Journal Of The American Academy Of Nurse Practitioners*. [s.i], p. 116-125. 2007.

WALF AA, FRYE CA. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Neuropsychopharmacology*. 30: 1288– 1201. 41. 2005.

WALKER, Q. D.; CABASSA, J.;KAPLAN, K. A.;HAROON, J.; SPOHR, H. A., et al. Sex differences in cocaine-stimulated motor behavior: disparate effects of gonadectomy. *Neuropsychopharmacology*, v.25, p.118–130, 2001.

WINTERSTEIN, AG. et al. Cardiac Safety of Methylphenidate Versus Amphetamine Salts in the Treatment of ADHD. *Pediatrics*, v.124, p. 31-38, 2009.

ANEXO 1 – Protocolo PP00903**Protocolo**

PP00903

Título

Metodologias utilizadas no Laboratório de Genética do Comportamento

Data de Entrada

18/11/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

21/03/2014

Considerações

Ofício nº 136/CEUA/PROPESQ/2014

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Geison de Souza Izidio, Departamento de Biologia, Embriologia e Genética – CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao projeto de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou por:

- APROVAÇÃO para a utilização de 720 ratos (*Rattus norvegicus*) pelo período de 4 anos a partir da data de credenciamento.**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)****Data 30/06/2018**

Data 31/03/2014

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE