

EDUARDO KUSER DE ALMEIDA

**Efeitos de drogas alfa 2 adrenérgicas em comportamentos
associados ao Transtorno de Déficit de
Atenção/Hiperatividade em duas linhagens isogênicas de
ratos.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina como
um requisito para a obtenção do
grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr.
Geison de Souza Izídio.
Co-orientador: Prof. Dr.
José Eduardo da Silva
Santos.

**FLORIANÓPOLIS
2019**

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

de Almeida, Eduardo Kuser

Efeitos de drogas alfa 2 adrenérgicas em
comportamentos associados ao Transtorno de Déficit
de Atenção/Hiperatividade em duas linhagens
isogênicas de ratos / Eduardo Kuser de Almeida ;
orientador, Geison De Souza Izídio, coorientador,
José Eduardo da Silva Santos., 2019.

85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

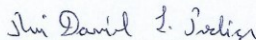
1. Farmacologia. 2. TDAH. 3. alfa adrenérgico.
4. SLA16. 5. SHR. I. De Souza Izídio, Geison. II. da
Silva Santos., José Eduardo. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia. IV. Título.

"Efeitos de drogas alfa 2 adrenérgicas em comportamentos associados ao transtorno de déficit de atenção/hiperatividade em duas linhagens isogênicas de ratos"

Por


Eduardo Kuser de Almeida

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (008/2019/PPGFM/C) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.

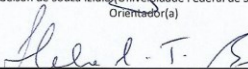


Prof.(a) Dr.(a) Rui Daniel Schröder Prediger
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

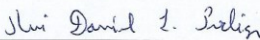
Banca examinadora:



Dr.(a) Geison de Souza Izídio (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Helena Maria Tannhauser Barros (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre)



Dr.(a) Rui Daniel Schröder Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2019.

Agradecimentos

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Geison de Souza Izídio, por ter me recebido no LGC em uma troca de laboratório, com toda certeza essa troca foi de suma importância para meu crescimento acadêmico e também pessoal, esse foi com certeza o melhor período da minha vida acadêmica, tendo uma pessoa na qual me espelho e possui imensa admiração como orientador, tendo me confiado a tarefa de realizar o primeiro *screening* noradrenérgico da linhagem SLA16, deixo aqui meus agradecimentos pela confiança depositada em mim.

Agradeço também aos colegas que passaram pelo Laboratório de Genética do Comportamento durante o período que foi realizado este trabalho, em especial a Natali Granzotto, pela grande ajuda que foi dada durante o trabalho, ao Guilherme Fadanni, pelas ajudas com estatísticas e outras coisas, aos IC's Santiago Canepa, Laís Ostaszewski, Nadia Rodrigues pela ajuda em experimentos, aos colegas Rachel Barros, Jéssica Squariz, Ariela Boeder, Ana Vieira e Julia Puñal, e a pós-doc Aline Guimarães pelas conversas e discussões realizadas, meu muito obrigado.

Ao prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos, pela coorientação e conselhos científicos dados. Um agradecimento muito especial também a colega Elaine Anton, pela imensa ajuda dada para a realização dos experimentos de pressão arterial, experimentos esses que não teriam acontecido sem a ajuda da Elaine. Agradeço também aos demais membros do Laboratório de Biologia Vascular, coordenado pelo prof. José Eduardo.

Aos membros da banca avaliadora, Helena Barros, Rui Prediger, Juliana Cavalli e Jamil Assreuy por terem aceitado avaliar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho, pelo período de internato e discussões científicas e também aos colegas do Laboratório de Farmacologia Molecular e Bioquímica, meu muito obrigado.

Ao prof. Dr. Daniel Mansur, pelos conhecimentos passados durante o estágio supervisionado.

Um agradecimento muito especial aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia, Ericks Sousa, Ana Jesse e ao já doutor Felipe Vanz pelos inúmeros bons momentos, conversas e risadas em seu laboratório.

Ao prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi, pelas conversas, pelos bares e pela confiança depositada em mim e no trabalho apresentado no XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.

Aos demais colegas das turmas de 2016/2 e 2017/1, pela convivência durante o cursão.

Aos bioteristas que passaram pelo LGC durante meu período de mestrado, que cuidaram com amor e carinho dos nossos animais.

À Alexandra Elbakyan, por quebrar as barreiras da ciência.

À minha namorada Carla Webber, quem fez muito deste trabalho ser possível, com sua ajuda em diversos aspectos, com o suporte dado e por toda dedicação.

À minha mãe, Luiza e a minha irmã Camila, por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

O transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH) é um transtorno geralmente diagnosticado na infância, sendo de alta prevalência em crianças e adolescentes, podendo persistir até a vida adulta. O tratamento do TDAH é baseado classicamente no uso de psicoestimulantes, contudo, drogas agonistas dos receptores α 2-adrenérgicos vem apresentando bons resultados em uso isolado ou em conjunto com estimulantes. Neste estudo, foram avaliados os efeitos dos agonistas α 2-adrenérgicos clonidina e guanfacina, utilizados na clínica para o tratamento do TDAH, em comportamentos associados ao TDAH nas linhagens SHR, considerada padrão-ouro para estudos do TDAH e SLA16, uma linhagem congênica desenvolvida em nosso laboratório. Os resultados mostraram que a clonidina foi capaz de reduzir a hiperatividade motora e a pressão arterial de ambas as linhagens em um regime de tratamento repetido (0,03 mg/kg), porém, apresentou efeitos “tipo-sedativo” em tratamento agudo (0,03 mg/kg). Na dose de 0,01 mg/kg a clonidina repetida não foi capaz de causar alterações comportamentais, contudo foi capaz de reduzir a pressão arterial dos animais. Ademais, foram encontradas diferenças de linhagem e tratamento e também efeitos marginais de linhagem e tratamento, que sugerem que a linhagem SLA16 pode ser mais sensível a agonistas α 2-adrenérgicos do que a linhagem SHR. Assim concluímos que a clonidina pareceu eficiente na redução da hiperatividade locomotora no regime de tratamento repetido (0,03 mg/kg), contudo, as drogas α 2-adrenérgicas não se mostraram eficientes em relação a memória de trabalho. Foi vista também uma possível maior sensibilidade à clonidina na linhagem SLA16.

Palavras-chave: SHR, SLA16, Clonidina, Guanfacina, TDAH, agonistas α 2-adrenérgicos.

ABSTRACT

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a disorder usually diagnosed in childhood that is highly prevalent in children and adolescents and may persist into adulthood. ADHD treatment is classically based on the use of psychostimulants; however, α_2 -adrenergic receptor agonists have shown to be of good use alone or in combination with stimulants. In this study, the effects of clonidine and guanfacina, two α_2 -adrenergic agonists used in the clinic for the treatment of ADHD, were evaluated in ADHD-associated behaviors in the SHR strain, considered the gold standard model for ADHD and SLA16 strain, a congenic rat strain developed in our laboratory. The results showed that clonidine was able to reduce hyperactivity and blood pressure in both strains in a repeated treatment regimen (0.03 mg/kg), however, clonidine showed effects "sedative-like" in acute treatment (0,03 mg/kg). At the dose of 0.01 mg/kg, repeated treatment with clonidine was not able to cause behavioral changes; however, it was able to reduce the blood pressure of the animals. In addition, strain and treatment differences were found, as well as marginal strain and treatment effects, suggesting that the SLA16 strain may be more sensitive to α_2 -adrenergic agonists than the SHR strain. Thus, we concluded that clonidine appeared to be effective in reducing locomotor hyperactivity in the repeated treatment (0.03 mg/kg), however, α_2 -adrenergic drugs were not efficient in relation to working memory, and possible higher sensitivity to clonidine in the SLA16 strain was also seen.

Keywords: SHR, SLA16, Clonidine, Guanfacine, ADHD, α_2 -adrenergic agonists.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Redes neurais envolvidas na fisiopatologia do TDAH. 2011.	22
Figura 2. Representação das projeções noradrenérgicas do locus coeruleus em encéfalo de rato.....	25
Figura 3. Neurotransmissão noradrenérgica.	26
Figura 4. Representação do desenvolvimento da linhagem SLA16	34
Figura 5. Representação do aparato utilizado no teste do LAM.....	38
Figura 6. Aparato utilizado no teste do CA.	39
Figura 7. Aparato utilizado no teste do Rotarod.....	40
Figura 8. Sistema utilizado para avaliação de pressão arterial direta.	41
Figura 9. Latência para encontrar a plataforma no labirinto aquático.....	47
Figura 10. Distância total percorrida no Campo Aberto	48
Figura 11. Número de entradas no centro do Campo Aberto....	49
Figura 12. Distância percorrida no centro do Campo Aberto. ...	49
Figura 13. Tempo no centro do Campo Aberto.....	50
Figura 14. Tempo de latência de queda no Rotarod.....	51
Figura 15. Distância total percorrida no Campo Aberto.	52
Figura 16. Número de entradas no centro do Campo Aberto....	52
Figura 17. Tempo no centro do Campo Aberto.....	53
Figura 18. Distância percorrida no centro do Campo Aberto. ...	53
Figura 19. Avaliação da pressão arterial sistólica.	54
Figura 20. Avaliação da pressão arterial diastólica.....	55
Figura 21. Distância total percorrida no Campo Aberto.	56
Figura 22. Número de entradas no centro do Campo Aberto....	57
Figura 23. Tempo no centro do Campo Aberto.....	57
Figura 24. Distância percorrida no centro do Campo Aberto. ...	58
Figura 25. Avaliação da pressão arterial sistólica.	59
Figura 26. Avaliação da pressão arterial diastólica.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelos animais utilizados no estudo do TDAH.	30
Tabela 2. Resumo dos experimentos executados neste trabalho.	45

LISTA DE ABREVIACOES

6-OHDA = 6-hidroxidopamina

ANOVA = Análise de Variância

CA = Campo aberto

CEUA/UFSC = Comitê de tica no uso de animais em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina.

CLO = Clonidina

COMT = Catecol-O-Metil Transferase

CPF = Córtex Pré-Frontal

DAT = Transportador de Dopamina

DCM = Defeito de Controle Moral

DSM = *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

EPM = Erro Padrão Médio

FDA = *Food and Drug Administration*

GUA = Guanfacina

IM = Intramuscular

IP = Intraperitoneal

LAM = Labirinto Aquático de Morris

LC = Locus Coeruleus

MAO = Monoamina Oxidase

mmHg = Milímetros de Mercúrio

NET = Transportador de Noradrenalina

NIH = National Institute of Health (EUA)

NK1 = Neurocinina 1

PA = Pressão arterial

PAD = Pressão Arterial Diastólica

PAS = Pressão Arterial Sistólica

Q.T.L. = *Qualitative Trail Locus*

SAL = Salina 0,9%

SHR = *Spontaneously Hypertensive Rats*

SLA16 = SHR.Lewis.Anxr16

SNC = Sistema Nervoso Central

TDA = Transtorno de déficit de Ateno

TDAH = Transtorno de Déficit de Ateno/Hiperatividade

TH = Tirosina Hidroxilase

WKY = Wistar Kyoto

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIÇÕES	13
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE (TDAH)	19
1.2. SISTEMA NORADRENÉRGICO	22
1.2.1. DROGAS α 2 NO TRATAMENTO DO TDAH.....	27
1.3. MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDOS DO TDAH....	29
1.3.1. SHR.....	30
1.3.2. SLA16	32
1.4. IMPORTÂNCIA DO USO DE FÊMEAS NA PESQUISA 34	
2. HIPÓTESE GERAL	35
3. OBJETIVO GERAL	35
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. ANIMAIS.....	37
4.2. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	37
2.2.1. LABIRINTO AQUÁTICO (LAM).....	37
2.2.2. CAMPO ABERTO (CA).....	38
2.2.3. ROTAROD.....	39

4.3.	AVALIAÇÃO DIRETA DE PRESSÃO ARTERIAL EM ANIMAIS ANESTESIADOS	40
4.4.	DROGAS.....	42
4.5.	DESENHO EXPERIMENTAL.....	43
4.5.1.	BLOCO EXPERIMENTAL 1: CLO e GUA repetidas na memória de trabalho, emocionalidade e atividade locomotora.....	43
4.5.2.	BLOCO EXPERIMENTAL 2: Avaliação dos efeitos da CLO aguda na emocionalidade, atividade locomotora e pressão arterial.....	43
4.5.3.	BLOCO EXPERIMENTAL 3: Avaliação dos efeitos de uma dose menor de CLO repetida na emocionalidade, atividade locomotora e pressão arterial.....	44
4.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
5.	RESULTADOS.....	47
5.1.	BLOCO EXPERIMENTAL 1.....	47
5.1.1.	EXPERIMENTO 1	47
5.1.2.	EXPERIMENTO 2	47
5.2.	BLOCO EXPERIMENTAL 2.....	50
5.2.1.	EXPERIMENTO 3	50
5.2.2.	EXPERIMENTO 4	51
5.2.3.	EXPERIMENTO 5	54
5.3.	BLOCO EXPERIMENTAL 3.....	55
5.3.1.	EXPERIMENTO 6	55
5.3.2.	EXPERIMENTO 7	58
6.	DISCUSSÃO.....	61

6.1.	BLOCO EXPERIMENTAL 1	63
6.2.	BLOCO EXPERIMENTAL 2	66
6.3.	BLOCO EXPERIMENTAL 3	68
7.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE (TDAH)

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é um transtorno multifatorial, de alta prevalência na infância e adolescência sendo caracterizado por uma tríade clássica que consiste em: hiperatividade, impulsividade e desatenção. Apresenta maior incidência em indivíduos do sexo masculino do que em indivíduos do sexo feminino, afetando aproximadamente 4,4% da população adulta e de 8 a 12% da população infantil em idade escolar. Entretanto, as mulheres são a maioria dos indivíduos com TDAH na idade adulta (BIEDERMAN et al., 1994; CURATOLO; D'AGATI; MOAVERO, 2010; DE ALWIS et al., 2014; JEW et al., 2013; PURPER-OUAKIL et al., 2011).

As primeiras descrições de transtornos semelhantes ocorreram em literaturas europeias, no final dos anos de 1700, e em literaturas norte americanas datadas do começo dos anos de 1800 (KELLY, 2018). Já a primeira descrição de sintomas do que, 200 anos mais tarde, viria a ser chamado de transtorno de déficit de atenção, foi feita por Sir Alexander Crichton, um médico escocês, em 1798. Ele fez uma apresentação dos sintomas de desatenção, entretanto sua descrição não pode ser inteiramente relacionada com o TDAH, pois não mencionou sintomas relacionados à hiperatividade (LANGE et al., 2010).

O ponto que para muitos é tido como marco científico inicial da descrição do TDAH ocorre com Sir George Frederic Still, em 1902. Ele descreveu uma condição anormal em crianças, sendo sugerido um defeito de controle moral (DCM) com sintomas como: 1- paixão; 2- maldade – crueldade; 3- ciúme; 4- ilegalidade; 5- desonestidade; 6- malícia libertina; 7- sem vergonha – imodéstia; 8- imoralidade sexual; e 9- viciosidade, sendo esses sintomas associados à auto recompensa e a satisfação pessoal imediata (LANGE et al., 2010; STILL, 1902). Para isso foram avaliados parâmetros diversos, como histórico familiar, estigmas de degeneração, tamanho e formato das cabeças das crianças analisadas e associações com transtornos mentais. Still, pioneiramente, apontou um fato visto até hoje na epidemiologia do TDAH, a proporção maior de meninos com DCM do que meninas.

Por volta de 1960, um transtorno com três sintomas característicos, sendo eles, hiperatividade, desatenção e impulsividade foi descrito e chamado de disfunção cerebral mínima (DCM). Acreditava-se que a hiperatividade estava associada a danos cerebrais, porém essa hipótese foi contestada anos mais tarde, pois não havia danos cerebrais em indivíduos com os sintomas antes associados ao DCM. Com a chegada da segunda edição do DSM, surgiu uma nova classificação para o quadro, também associado ao DCM, que foi classificado como reação hipercinética da infância, ou síndrome hipercinética (LANGE et al., 2010; MAHONE; DENCKLA, 2017).

Na terceira edição do DSM, em 1980, a síndrome hipercinética, ou reação hipercinética da infância, recebeu o nome de transtorno do déficit de atenção (TDA), sendo ele com ou sem hiperatividade. Contudo, foi visto que o TDA sem hiperatividade possuía um perfil distinto do TDA com hiperatividade, sendo ele mais letárgico, hipoativo e menos agressivo. Por esse motivo, na revisão desta mesma terceira edição do DSM, o transtorno passou a se chamar pelo nome utilizado até hoje, transtorno do déficit de atenção/hiperatividade (LANGE et al., 2010; MAHONE; DENCKLA, 2017).

A quarta edição do DSM apresentou mudanças e acresceu subtipos de TDAH, sendo os subtipos, impulsivo, hiperativo e desatento. Os subtipos hiperativo e impulsivo estariam mais presentes em indivíduos do sexo masculino e o subtipo desatento mais presente em indivíduos do sexo feminino. Algumas evidências apontam que este fato se deva as diferenças sexuais na fase de desenvolvimento do cérebro, ou diferenças anatômicas em entre os sexos. Por exemplo, alguns estudos mostram que indivíduos do sexo feminino com TDAH apresentam um menor tamanho nas regiões medial e orbito-frontal em comparação ao perfil de TDAH masculino (CURATOLO; D'AGATI; MOAVERO, 2010; LANGE et al., 2010; MAHONE; DENCKLA, 2017; NUNES et al., 2018).

Atualmente, segundo o DSM-V (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION APA, 2013) os critérios de diagnósticos do TDAH são padrões persistentes de desatenção, hiperatividade ou impulsividade. Os padrões de desatenção são relacionados com comportamentos de dificuldade em manter foco, desorganização e baixa persistência. Os padrões relativos à hiperatividade são associados à alta atividade motora em momentos inapropriados e

conversa em excesso. Em adultos, a hiperatividade se manifestaria em forma de inquietude. Já a impulsividade se refere a ações precipitadas, com alto potencial de dano para o indivíduo, que pode estar associado a um desejo por recompensas imediatas. Os comportamentos impulsivos podem ser manifestados em forma de intromissão social, por exemplo, quando o indivíduo não consegue esperar o seu momento de fala, ou tomadas de decisões que afetem sua vida em longo prazo (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION APA, 2013; MAHONE; DENCKLA, 2017). Para que o seu diagnóstico seja feito, o paciente deve preencher pelo menos 6 critérios de desatenção e também 6 ou mais critérios de hiperatividade e impulsividade. Além disso, os perfis podem ser classificados em leve, moderado ou grave, variando de acordo com a intensidade dos sintomas presentes (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION APA, 2013).

Algumas bases neurobiológicas já foram propostas para explicar as alterações comportamentais exibidas por pessoas com TDAH, sendo elas associadas principalmente ao córtex pré-frontal e regiões as quais fazem ou recebem projeções do mesmo (fig. 1) (CURATOLO; D'AGATI; MOAVERO, 2010; PURPER-OUAKIL et al., 2011; RUSSELL, 2011; RUSSELL; SAGVOLDEN; JOHANSEN, 2005). Dentre elas, as mais estudadas e compreendidas são as alterações nas vias dopaminérgicas centrais (Para revisão ver: CURATOLO; D'AGATI; MOAVERO, 2010; OADES et al., 2005; PURPER-OUAKIL et al., 2011; THAPAR; COOPER, 2016).

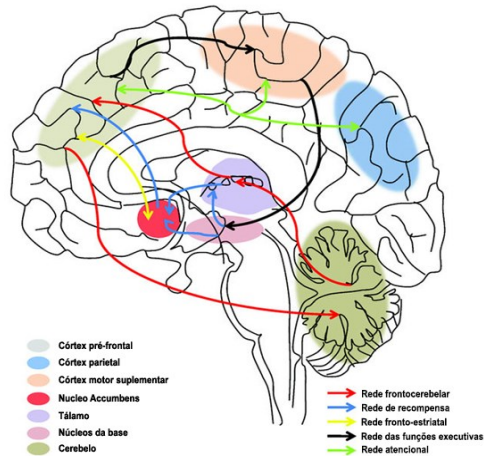


Figura 1. Representação das redes neurais envolvidas na fisiopatologia do TDAH. Adaptado de Purper-Ouakil *et al.*, 2011.

1.2. SISTEMA NORADRENÉRGICO

Em 1895, Oliver e Schafer (OLIVER; SCHAFFER, 1895) encontraram efeitos vasoconstritores em extratos de glândula suprarrenal. Alguns anos mais tarde, em 1897, John Jacob Abel, utilizando glândulas suprarrenais de ovelhas, isolou uma substância cristalina, a qual acreditava ser a responsável pelos efeitos vasoconstritores descritos por Oliver e Schafer, nomeando a substância de epinefrina (do grego, *epi nephris*, acima dos rins) (FEINSTEIN; KALININ; BRAUN, 2016). Contudo, a substância isolada por Abel se tratava de uma substância menos ativa que o extrato bruto descrito por Oliver e Schafer, (BENNETT; SC, 1999; PARASCANDOLA, 2010).

Em 1901, Jokichi Takamine, um químico industrial, purificou a epinefrina de Abel, isolando apenas o seu princípio ativo, patenteando-o como *Adrenalin* (do latim, *ad renes*, próximo aos rins) (FEINSTEIN; KALININ; BRAUN, 2016). Também em 1901, Thomas Aldrich, que havia trabalhado no laboratório de Abel, usando um método diferente do utilizado por Takamine, isolou uma substância cristalina proveniente da glândula suprarrenal, que era idêntica a isolada por Takamine. Sua fórmula

para o composto era um pouco diferente, contudo se mostrou ser a correta (ALDRICH, 1901; PARASCANDOLA, 2010).

Thomas Elliott em 1904 publicou que a adrenalina parecia ser um estimulante químico liberado através da estimulação periférica (BENNETT; SC, 1999; ELLIOTT, 1905). Entretanto, a visão de Elliott não foi bem aceita, até que em 1921 Loewi em um experimento clássico, provou que a liberação de uma substância transferida de um coração de rã para outro coração causava a inibição deste (RANG et al., 2016) provando assim a existência da transmissão química.

Em 1910, Dale e Barger publicaram um artigo no qual caracterizaram uma série de aminas, que apresentavam um grupamento catecol. Anos mais tarde essas viriam a ser chamadas de catecolaminas, mas foram inicialmente nomeadas por eles de aminas simpatomiméticas, por conta de sua relação com a ação das inervações do sistema nervoso simpático (DALE; BARGER, 1910).

Nesse mesmo artigo, eles viram que uma molécula com alta similaridade com a adrenalina, não tinha seu efeito revertido pela ergotoxina, que revertia o efeito vasoconstritor da adrenalina. Esse pode ser considerado o primeiro relato de efeitos relacionados a essa substância (DALE; BARGER, 1910). Em 1945, a substância seria caracterizada por Urich von Euler como um neurotransmissor, que por suas semelhanças estruturais com a adrenalina, alguns anos mais tarde viria a ser chamado de noradrenalina (EULER, 1945).

Em 1954, Marthe Vogt viu que a noradrenalina também estava presente no sistema nervoso central (SNC), em diversas regiões do cérebro em concentrações consideradas altas (VOGT, 1954). Dahlström e Fuxe em uma série de experimentos realizados foram os primeiros a identificar o grupo A6 (Locus Coeruleus; LC) como a principal fonte de noradrenalina no SNC (FUXE, 1965; SCHWARZ; LUO, 2015).

O LC é uma pequena região com aproximadamente 3600 neurônios em ratos adultos (FEINSTEIN; KALININ; BRAUN, 2016), que possui projeções para todo o neocórtex, para o tálamo, hipocampo, amígdala, tronco encefálico entre outras estruturas. Suas funções são relacionadas à resposta ao stress, emoção, aprendizado e memória, ciclo de sono-vigília, atenção, motivação (BOURET; SARA, 2010; SCHWARZ; LUO, 2015).

A noradrenalina desempenha um importante papel de neurotransmissão no SNC, tendo sua via de síntese ligada à de outra importante catecolamina, a dopamina. A síntese da noradrenalina é realizada a partir da L-tirosina, um aminoácido essencial encontrado em todos os tecidos que sintetizam catecolaminas, como glândulas suprarrenais, fibras simpáticas e no cérebro (MUSACCHIO, 1975). A L-tirosina sofre uma hidroxilação através da enzima tirosina hidroxilase (TH) convertendo-se em L-dopa. Essa L-dopa produzida pela ação da TH, sofre um processo de descarboxilação através da L-dopa descarboxilase, transformando-se em dopamina. A dopamina é então armazenada em neurônios dopaminérgicos, ou rapidamente hidroxilada e convertida em noradrenalina através da dopamina- β -hidroxilase, em neurônios noradrenérgicos (MUSACCHIO, 1975).

A classificação dos receptores adrenérgicos veio em 1948 por Ahlquist, que encontrou dois padrões de resposta distintos enquanto estudava algumas catecolaminas como a noradrenalina, a adrenalina e a isoprenalina. Com base nesses padrões observados, ele postulou a existência de duas famílias de receptores adrenérgicos, α e β , que foram definidos de acordo com a potência dos agonistas.

Os receptores α possuíam maior afinidade pela noradrenalina e menor afinidade pela isoprenalina, enquanto o inverso acontecia para os receptores β , que possuíam maior afinidade pela isoprenalina e menor afinidade pela noradrenalina (RANG et al., 2016). Alguns anos após a classificação das famílias de receptores adrenérgicos, descobriu-se que cada família possui subtipos e os receptores α possuem subclasses dentro dos seus subtipos. Por exemplo, a família de receptores α , possui 2 subclasses, os receptores α_1 , mais presentes na periferia e α_2 , atuando predominantemente no SNC, tendo funções regulatórias e inibitórias. Cada uma dessas subclasses de receptores α possui 3 subtipos diferentes, sendo elas (α_1A , α_1B , α_1D e α_2A , α_2B , α_2C). Já a família de receptores β possui 3 subtipos de receptores, os receptores β_1 , β_2 e β_3 , totalizando 9 subtipos, sendo que todos são receptores acoplados à proteína G (RANG et al., 2016).

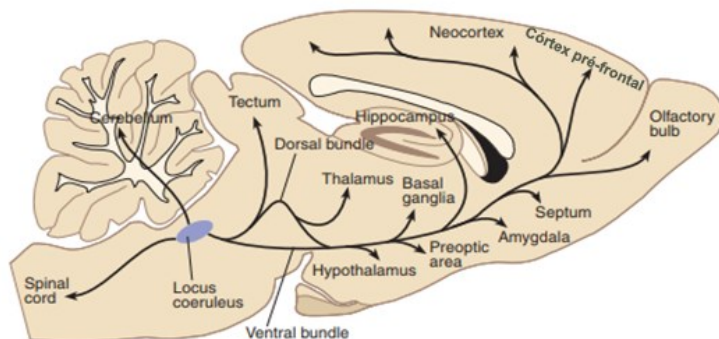


Figura 2. Representação das projeções noradrenérgicas do *locus coeruleus* em encéfalo de rato. Adaptado de Neil R. Carlson, 2013.

Os receptores α_2 -adrenérgicos possuem um importante papel na regulação do sistema noradrenérgico, sendo os receptores α_2A e α_2C os principais responsáveis por inibir a liberação de noradrenalina nos neurônios noradrenérgicos. Ambos são expressos tanto em neurônios pré-sinápticos quanto em neurônios pós-sinápticos (fig. 3) (BRUNTON LAURENCE L, RANDA HILAL-DANDAN, 2018; RANG et al., 2016). Os receptores α_2A são também os principais receptores noradrenérgicos pré-sinápticos, e os mais expressos no CPF (BRIAN P. RAMOS; ARNSTEN, 2009). Dentre os receptores adrenérgicos, os receptores α_2A são os mais expressos no SNC, os quais provavelmente são responsáveis pelos efeitos sedativos, hipotensores e comportamentais de agonistas α_2 (BRUNTON LAURENCE L, RANDA HILAL-DANDAN, 2018).

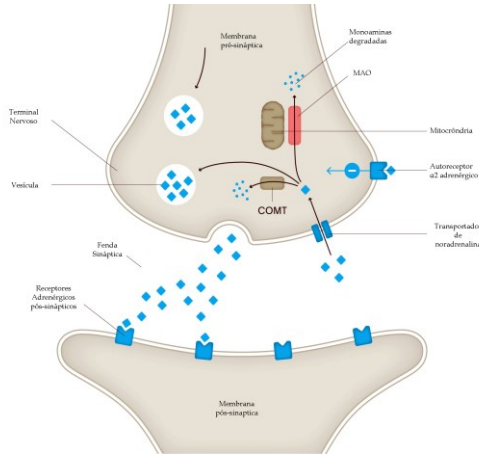


Figura 3. Neurotransmissão noradrenérgica. Após sua síntese, a noradrenalina é vesiculada e liberada na fenda sináptica, podendo interagir com os receptores adrenérgicos pré- e pós-sinápticos, ser recaptada pelo transportador de noradrenalina ou ser degradada pelas enzimas catecol-O-metil transferase (COMT) e monoamina oxidase (MAO). Adaptado de <http://institute.progress.im/en/content/normal-process-noradrenaline-synaptic-activity>.

Assim como o sistema dopaminérgico, estudos apontam que alterações nas vias noradrenérgicas também estão envolvidas com o TDAH. Por exemplo, Arnsten e colaboradores (1996) em estudos com primatas não-humanos, demonstraram que os agonistas α_2 -adrenérgicos clonidina (CLO) e guanfacina (GUA) foram capazes de melhorar a memória de trabalho dos animais. Já a ioimbina, um antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, reverteu esses efeitos ao ser infundida no córtex pré-frontal (CPF) dos animais e resultou em comportamentos hiperativos. Entretanto, o agonista α_1 -adrenérgico prazosina, não foi capaz de reverter esses efeitos e não causou essas alterações comportamentais, dando indícios da influência dos receptores α_2 -adrenérgicos na hiperatividade (ARNSTEN; STEERE; HUNT, 1996). Isso corrobora com estudos de Kornetsky, que em observações de efeitos comportamentais de anfetaminas,

levantou a hipótese que a hiperatividade seria causada por uma hiperativação noradrenérgica. Essa hipótese serviu para Zametkin propor que a hiperativação seja causada por uma hipofunção dos auto receptores α 2-adrenérgicos (BIEDERMAN; SPENCER, 1999).

Também Franowicz e colaboradores, em um experimento com camundongos com uma mutação nos receptores α 2A, mutação essa que ocasionou uma redução de aproximadamente 80% na densidade destes receptores, demonstraram que esses animais tiveram a memória de trabalho prejudicada. Além desse prejuízo na memória de trabalho, esses animais não responderam ao tratamento com GUA, que melhorou a memória de trabalho dos animais controle (FRANOWICZ et al., 2002).

Além disso, alguns estudos apontam genes noradrenérgicos associados ao TDAH, como os genes dos receptores α 2A e α 2C, (ADRA2A e ADRA2C, respectivamente) e o gene do transportador de noradrenalina NET1/SLAC6A2 (FRANOWICZ et al., 2002; LEAHY, 2017; LIU et al., 2018).

1.2.1. DROGAS α 2 NO TRATAMENTO DO TDAH

O tratamento do TDAH classicamente se baseia em psicoestimulantes, sendo o metilfenidato e as anfetaminas as drogas de primeira escolha (CAYE et al., 2018). Entretanto, os psicoestimulantes apresentam diversos efeitos adversos como a taquicardia, estimulação locomotora, euforia, perda de apetite, irritabilidade, insônia, efeitos relacionados à retirada do medicamento e em alguns casos podem ocorrer efeitos ansiogênicos relacionados ao uso do metilfenidato ou de anfetaminas (CAYE et al., 2018; DAUGHTON et al., 2012; RANG et al., 2016).

Estudos vêm mostrando a eficiência das drogas adrenérgicas na melhoria de sintomas comportamentais, uma vez que a ativação noradrenérgica central está associada à modulação de funções corticais como a atenção, memória de trabalho, concentração e a hiperatividade, dando força à hipótese noradrenérgica deste transtorno (BIEDERMAN; SPENCER, 1999; BILDER et al., 2016; DAUGHTON et al., 2012; HERVAS et al., 2014; KAWAURA et al., 2014). Dentre essas, estão algumas drogas não psicoestimulantes, como a atomoxetina, a GUA e a CLO. Elas ganharam lugar no mercado, sendo utilizadas

principalmente em pacientes refratários aos psicoestimulantes como o metilfenidato, além de não apresentarem os efeitos adversos relacionados aos psicoestimulantes podendo ser utilizadas sozinhas ou combinadas com psicoestimulantes (CAYE et al., 2018; MCCRACKEN et al., 2016).

A GUA, um agonista $\alpha 2A$ adrenérgico seletivo, possui 60 vezes mais seletividade para o receptor $\alpha 2A$ do que para o receptor $\alpha 2B$ e 20 vezes para $\alpha 2A$ do que para $\alpha 2C$. Sua ação se dá principalmente nos receptores $\alpha 2A$ pós-sinápticos no CPF, tendo afinidade 10 vezes menor para os receptores pré-sinápticos, resultando em baixas taxas sedativas (ÁLAMO; LÓPEZ-MUÑOZ, 2016; GORMLEY; TURNER; FREELAND, 2014).

A GUA, classicamente de uso anti-hipertensivo, teve seu uso para o tratamento de TDAH aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 2009, apresentando bons índices de segurança e eficácia. Entretanto, com efeitos adversos que incluem sonolência, fadiga e dores abdominais, que aparentam ser dose-dependente (GORMLEY; TURNER; FREELAND, 2014). Em diversos estudos realizados, foram vistas melhoras em sintomas gerais do TDAH como memórias de trabalho, hiperatividade, atenção, no controle inibitório e em casos relacionados com drogas de abuso, sendo seu uso isolado ou combinado com psicoestimulantes (HERVAS et al., 2014; JÄKÄLÄ et al., 1999; KAWAURA et al., 2014; MATHAI et al., 2017; MCCRACKEN et al., 2016; PERRY et al., 2015; RUGGIERO et al., 2014; SAGVOLDEN, 2006; SIRVIO et al., 1991; TERRY et al., 2014).

A CLO, assim como a GUA, também é historicamente conhecida por seu uso como anti-hipertensivo. A CLO também é um agonista $\alpha 2$ -adrenérgico, contudo, não seletivo. Seu uso foi aprovado em 2010 pelo FDA para o tratamento do TDAH, entretanto, diferentemente da GUA, a CLO atua tanto nos receptores pré quanto pós-sinápticos. Essa não seletividade da CLO pelos receptores pós-sinápticos faz com que ela possua diversos efeitos adversos de alta incidência como sedação, boca seca, confusão mental e hipotensão (DAUGHTON et al., 2012; GORMLEY; TURNER; FREELAND, 2014).

Assim como a GUA, estudos demonstram a efetividade da CLO para o TDAH, melhorando principalmente sintomas associados à hiperatividade. Porém, por conta dos efeitos sedativos associados à CLO, sua prescrição isolada não é muito

comum, sendo mais frequentemente utilizada em conjunto com outros psicoestimulantes (CAYE et al., 2018; DAUGHTON et al., 2012; GORMLEY; TURNER; FREELAND, 2014).

1.3. MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDOS DO TDAH

Para uma maior compreensão da neurobiologia dos transtornos psiquiátricos, assim como para melhor avaliar os efeitos dos fármacos, e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, faz-se necessária a pesquisa básica, na qual são utilizados modelos animais.

Para considerar um animal como modelo para o TDAH, este modelo precisa cumprir alguns critérios de validade, sendo eles: (1) Validade de face, na qual o modelo precisa mimetizar aspectos comportamentais fundamentais do TDAH; (2) Validade de construto, na qual o modelo possua uma etiologia e fisiopatologia semelhantes ao TDAH em humanos; (3) Validade preditiva, onde o modelo deve apresentar respostas semelhantes ao tratamento utilizado em humanos, bem como mecanismos associados ao TDAH, além de prever aspectos genéticos, biológicos, comportamentais e de abordagens terapêuticas, não avaliadas na clínica (RUSSELL, 2007, 2011; RUSSELL; SAGVOLDEN; JOHANSEN, 2005; SAGVOLDEN, 2000).

Em relação a animais modelo de TDAH os mais amplamente utilizados são os roedores, pois apresentam maior homogeneidade genética; são mais baratos para serem mantidos; as condições de controle ambiental são mais fáceis de serem reproduzidas; o ciclo reprodutivo dos roedores faz com que um maior número de animais esteja disponível para uso; além de possuírem uma neurobiologia mais estudada que os primatas não-humanos (RUSSELL; SAGVOLDEN; JOHANSEN, 2005).

Entretanto, deve-se ressaltar que não existe um modelo animal perfeito, todos possuem algumas limitações, pois não existe um que consiga replicar completamente um transtorno psiquiátrico humano. O que podemos observar nos animais são apenas comportamentos associados a um transtorno humano. Sendo assim, na atualidade, é impossível inferir que o animal possui TDAH, mas sim que apresenta comportamentos relacionados ou “tipo” TDAH.

Existem diversos modelos, como os baseados em manipulações genéticas, por exemplo, os camundongos nocaute

para o DAT (transportador de dopamina); camundongos coloboma; camundongos nocaute para o receptor NK1 (neurocinina 1); camundongos nocaute para a subunidade beta-2 do receptor colinérgico de nicotina. Existem também modelos induzidos quimicamente, como os ratos submetidos à injeção neonatal da neurotoxina 6-OHDA (6-hidroxidopamina), ratos expostos ao etanol pré-natal (RUSSELL, 2007, 2011).

A tabela 1 resume alguns dos principais modelos de roedores utilizados para estudar o TDAH.

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

Tabela 1. Modelos animais utilizados no estudo do TDAH. Adaptado de Pandolfo, 2010.

1.3.1. SHR

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos, do inglês *Spontaneous Hypertensive Rats* (SHR) foi desenvolvida a partir de uma seleção de um fenótipo hipertenso de animais da linhagem Wistar por Okamoto e Aoki (OKAMOTO; AOKI, 1963). Eles selecionaram um animal macho que apresentava pressão arterial elevada (150 a 175 mmHg) desde a sétima semana de idade, e esse foi pareado com uma fêmea de pressão um pouco acima do normal (130 a 140 mmHg), obtendo-se 36 animais F₁. Os animais F₁ foram divididos em 2 grupos, os considerados normotensos (pressão arterial sistólica igual ou inferior a 149 mmHg) e os hipertensos (pressão sistólica igual ou superior a 150 mmHg). Após os ratos foram selecionados de forma que as cruzas fossem entre irmão e irmã, resultando assim em uma geração F₂

de ratos hipertensos, ou normotensos. O processo foi seguido até a geração F₆ onde se considerou a “linhagem estável”, pois 100% dos animais apresentavam hipertensão espontânea com 15 semanas de idade (OKAMOTO; AOKI, 1963). Com isso, uma nova linhagem de animais para estudos cardiovasculares foi desenvolvida e consolidada.

Desde o início da década de 1980, a linhagem SHR começou a ser vista como um bom modelo de estudos para comportamentos hiperativos por Terje Sagvolden e colaboradores (BERGER; SAGVOLDEN, 1998; KNARDAHL; SAGVOLDEN, 1981; MOSER et al., 1988). Inclusive, o próprio Sagvolden propôs a validação da linhagem SHR como modelo de estudos para o TDAH (SAGVOLDEN, 2000). Desde então, essa linhagem vem sendo a mais utilizada e vem sendo considerada o modelo “padrão ouro” para estudos do TDAH (PAMPLONA et al., 2009; PREDIGER et al., 2005; RUSSELL, 2007, 2011; RUSSELL; SAGVOLDEN; JOHANSEN, 2005). Os SHR cumprem a maioria dos critérios de validade para serem tratados como modelo de TDAH. Por exemplo, eles apresentam baixo desempenho no teste de *5-choice serial reaction test (5-csrt)* sugerindo desatenção elevada. A linhagem SHR apresenta também dificuldades na atenção sustentada; impulsividade motora; hiperatividade não presente em um ambiente novo, desenvolvendo-a com o tempo e situações não desafiadoras; assim como crianças com TDAH; e preferem recompensas imediatas menores a recompensas maiores tardias, um comportamento associado à impulsividade (KIM et al., 2012; RUSSELL; SAGVOLDEN; JOHANSEN, 2005). Kim e colaboradores (KIM et al., 2012), em um paradigma que avalia comportamentos tipo-impulsivos, mostraram que em comparação à linhagem WYK (Wistar Kyoto) os SHR apresentavam maior impulsividade, que foi revertida com o tratamento com metilfenidato.

Os SHR apresentam aspectos neurobiológicos similares aos encontrados em humanos com TDAH, ou seja hipofunção dopaminérgica no CPF, redução no armazenamento vesicular de dopamina e aumento da quantidade de receptores D1 e D2 dopaminérgicos (PREDIGER; FERNANDES; TAKAHASHI, 2005; RUSSELL, 2011). Os SHR também apresentam uma hiperfunção noradrenérgica, causada por prejuízos na função dos auto-

receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos responsáveis pela regulação da liberação noradrenérgica no CPF, resultando em um aumento na liberação de noradrenalina (RUSSELL, 2011).

Por seus aspectos neurobiológicos e comportamentais semelhantes ao encontrado em pacientes humanos com TDAH, a linhagem SHR é considerada o “padrão ouro” para estudos de aspectos gerais associados ao TDAH. Contudo, como qualquer modelo animal para estudos de transtornos psiquiátricos humanos, ela apresenta limitações, uma delas é a hipertensão, que não está diretamente associada ao TDAH em humanos (FAN; BRUNO; HESS, 2011; SAGVOLDEN; JOHANSEN, 2012). Por conta desta limitação da alta pressão arterial, estudos para validação de outros modelos não-hipertensos fazem-se necessários para melhor entender a neurobiologia deste transtorno.

1.3.2. SLA16

A linhagem SLA16 (SHR.Lewis-Anxrr16) foi desenvolvida no nosso laboratório (Laboratório de Genética do Comportamento, LGC) a partir de cruzamentos entre a linhagem doadora (Lewis) e a linhagem receptora (SHR) com intuito de melhor entender o papel do *locus* Anxrr16, envolvido em comportamentos emocionais.

O desenvolvimento desta linhagem foi descrito por De Medeiros (DE MEDEIROS et al., 2013). Inicialmente foram realizados cruzamentos entre matrizes da linhagem Lewis (fêmeas) e matrizes da linhagem SHR (machos), sendo que os animais híbridos resultantes deste cruzamento foram retrocruzados com animais da linhagem SHR. Estima-se que após 10 gerações aproximadamente 98% do genoma destes animais, fosse proveniente da linhagem SHR, exceto o *locus* Anxrr16, que é proveniente da linhagem Lewis (DE MEDEIROS et al., 2013) (fig. 4).

Mesmo com um genoma quase idêntico aos animais da linhagem SHR, nosso grupo vem mostrando que os animais da linhagem SLA16 apresentam maiores índices locomotores que os SHR sendo que isso acontece principalmente quando existe um

fator novidade envolvido no teste (ANSELM I et al., 2016; DE MEDEIROS et al., 2013; FADANNI, 2018; GRANZOTTO, 2016). Foram também encontradas diferenças sexuais nos índices de locomoção e emocionalidade destas linhagens, onde as fêmeas apresentam maior locomoção e menor emocionalidade do que machos (ANSELM I et al., 2016; DE MEDEIROS et al., 2013; SQUARIZ, 2018). Essa diferença de sexo sugere que as fêmeas possam ser bons modelos de estudo para comportamentos relacionados à hiperatividade, como os exibidos no subtipo hiperativo do TDAH, que, no entanto, na clínica apresenta prevalência em indivíduos do sexo masculino. Além das diferenças comportamentais, acredita-se que a linhagem SLA16 possui pressão arterial mais baixa do que a linhagem SHR (CORRÉA, 2015; RAMBORGER, 2017).

Além disso, Pértile e seus colaboradores demonstraram que as concentrações de DAT e do receptor D2 no hipocampo dos SLA, não possuem diferenças em relação aos SHR, sugerindo uma hipofunção dopaminérgica semelhante à encontrada nos SHR (PÉRTILE et al., 2017).

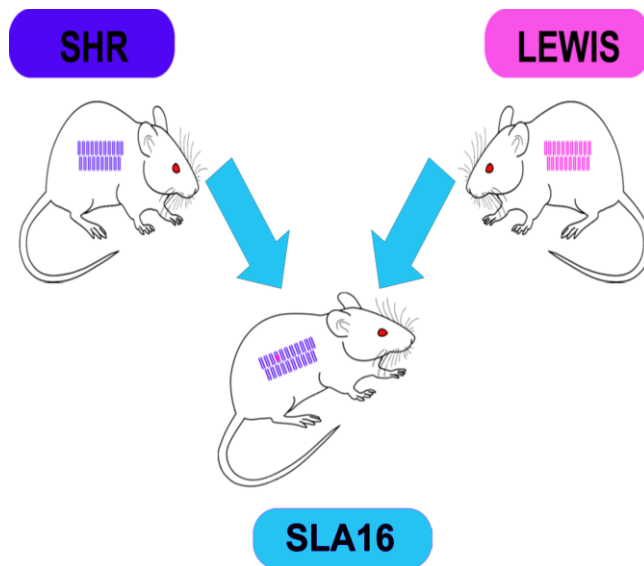


Figura 4. A linhagem SLA16 possui o genoma idêntico aos animais da linhagem SHR, exceto o *locus Anxrr16*, localizado no cromossomo 4, oriundo da linhagem Lewis.

1.4. IMPORTÂNCIA DO USO DE FÊMEAS NA PESQUISA

Apesar de que diversos transtornos psiquiátricos são de alta prevalência em mulheres, como os transtornos relacionados à ansiedade (KOKRAS et al., 2012) ou o TDAH de subtipo desatento (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION APA, 2013) diversos autores demonstraram haver uma grande disparidade sexual na pesquisa pré-clínica. Na maioria dos estudos são utilizados apenas machos, uma pequena parcela utiliza animais de ambos os sexos e outra pequena parcela apenas fêmeas (SIMPSON; KELLY, 2012). Estudos de nosso grupo, demonstraram que as fêmeas parecem ser um melhor modelo para estudos de comportamentos tipo-hiperativo, apresentando maiores índices locomotores em relação aos machos (DE MEDEIROS et al., 2013; SQUARIZ, 2018), demonstrando a importância do uso de fêmeas em estudos de comportamentos associados ao subtipo hiperativo do TDAH. Entretanto, já existem estudos que demonstram diferentes respostas farmacológicas em machos e fêmeas (SHAH; MCCORMACK; BRADBURY, 2014), o que reforça a importância de estudos de pesquisa básica nos dois sexos.

Em 2014, o NIH (*National Institute of Health*) publicou um *guideline* para os futuros financiamentos da instituição. Dentre os requisitos, está a necessidade do uso tanto de fêmeas, quanto machos em pesquisas pré-clínicas (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2014). Esta iniciativa é de suma importância para a redução de vieses sexuais na pesquisa pré-clínica, além de contribuir na melhoria da reprodutibilidade dos trabalhos (COLLINS; TABAK, 2014; MCCULLOUGH et al., 2014).

2. HIPÓTESE GERAL

As drogas α 2-adrenérgicas diminuem a hiperatividade de ratas das linhagens SHR e SLA16.

As drogas α 2-adrenérgicas melhoram a memória de trabalho de ratas das linhagens SHR e SLA16.

3. OBJETIVO GERAL

Com base ao que foi exposto na introdução, esse trabalho se propôs a tentar reduzir alguns comportamentos relacionados ao TDAH, exibidos pelas linhagens SHR e SLA16, com drogas α 2-noradrenérgicas.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Bloco experimental 1

Investigar os efeitos da CLO e da GUA repetidas, na memória de trabalho no Labirinto Aquático de Morris (LAM) e na emocionalidade e atividade locomotora no Campo Aberto (CA).

Bloco experimental 2

Avaliar os efeitos da CLO aguda na emocionalidade e atividade locomotora no CA e Rotarod seguido de avaliação de pressão arterial direta.

Bloco experimental 3

Avaliar os efeitos de uma dose menor de CLO repetida no CA seguido de avaliação de pressão arterial direta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizadas ratas das linhagens SHR e SLA16 os quais foram criados no biotério do Laboratório de Genética do Comportamento e alojados de 4 a 6 animais por gaiola, com idade entre 90 e 120 dias, com temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclos claro/escuro de 12 em 12h (luzes ligadas das 7:00 às 19:00h). Os animais tiveram acesso à água e comida *ad libitum*. Os números amostrais e idades dos animais são descritos a cada protocolo. Todos os procedimentos comportamentais foram realizados no Laboratório de Genética do Comportamento e os procedimentos de pressão arterial foram realizados no Laboratório de Biologia Vascular, sendo executados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina – CEUA/UFSC, aprovados sob os protocolos PP00903 e nº 5371190815.

4.2. TESTES COMPORTAMENTAIS

2.2.1. LABIRINTO AQUÁTICO (LAM)

O labirinto aquático foi um teste desenvolvido por Richard Morris e proposto como teste para avaliar alguns parâmetros de memória em 1981 e 1982 (MORRIS, 1981; MORRIS et al., 1982), podendo ser utilizado em protocolos de memória como memórias espaciais e de trabalho. O aparato utilizado consiste em um tanque circular de 1,7m de diâmetro, 80 cm de altura e 60 cm de profundidade com adesivos como pistas espaciais colados nas paredes da sala (fig. 5). Um ar condicionado também estava presente próximo ao tanque, servindo também como pista espacial. O tanque foi preenchido com água em temperatura média de 22 a 24°C até 60 cm. Uma plataforma de acrílico transparente 10x10 cm submersa a 1 cm do nível da água foi posicionada em 4 pontos, Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste. O tanque foi virtualmente dividido nas posições Norte, Sul, Leste e Oeste, sendo esses os pontos de início dos *trials* realizados durante o teste.

Neste trabalho foi utilizado um protocolo de memória de trabalho (DUDCHENKO, 2004; MIYOSHI et al., 2002), que consiste em 4 dias de treino onde o animal passa por 4 *trials* em cada dia. Cada *trial* iniciou em um ponto cardinal diferente no tanque de forma pseudorrandômica. A plataforma submersa era

trocada de lugar a cada novo dia de treino. Os *trials* tiveram critérios para término a localização da plataforma pelo animal, ou 60 segundos de nado sem sucesso para encontrar a plataforma. Nesse último caso, os animais foram guiados gentilmente até a plataforma, onde tiveram que permanecer por 30 segundos antes de iniciar um novo *trial*. Após o final do treino, os animais foram alocados em caixas individuais sob aquecimento de lâmpada infravermelha. Os dados foram analisados através de vídeos no *software* ANY-MAZE® (Stoelting, EUA) tendo como critério avaliado o tempo de latência para encontrar a plataforma.

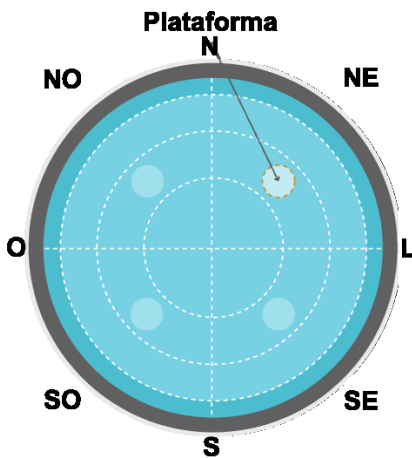


Figura 5. Representação do LAM. Fonte: maze engineers.

2.2.2. CAMPO ABERTO (CA)

O teste do campo aberto foi proposto por Calvin Hall em 1934 e se consolidou como um teste clássico para estudos que avaliam traços de emocionalidade e/ou locomoção em animais de laboratório (HALL, 1934). O aparato consiste em uma arena de 1 m² com paredes de 40 cm de altura de fundo escuro para posterior avaliação (fig. 6), onde os animais permaneceram por 5 minutos sob iluminação de 12 lux. Para o início do teste, os animais foram devidamente posicionados no centro do CA e liberados para exploração. Para avaliação dos vídeos e processamento dos dados foi utilizado o *software* ANY-maze® (Stoelting, EUA) no qual o aparato foi virtualmente dividido em área central e área

periférica, sendo a área periférica (100x20cm) a mais próxima das paredes do aparato e a área central (60x60) a zona no centro do aparato. No protocolo utilizado foram avaliados os parâmetros de distância total percorrida, distância no centro, o número de entradas no centro e o tempo no centro. O aparato foi limpo antes do início do teste de cada animal com solução de álcool 10% e papel toalha.



Figura 6. Aparato utilizado no teste do CA. Fonte: Fadanni, 2018.

2.2.3. ROTAROD

O teste do rotarod foi desenvolvido por Dunham em 1957, sendo inicialmente proposto para detectar prejuízo neurológico em ratos e camundongos, enquanto determinava a neurotoxicidade de anticonvulsivantes (DUNHAM; MIYA, 1957). O aparato utilizado é constituído por um cilindro de metal com rotação que pode ser mantida na rotação mínima de 5 rpm, ou colocado em aceleração constante até 37 rpm, com baias divididas por uma parede metálica.

A base de cada baia possui um dispositivo que é acionado com a queda do animal do cilindro, parando o contador automaticamente (fig. 7). Atualmente, o teste do rotarod passou a ser utilizado em testes de avaliação de coordenação motora (SHIOTSUKI et al., 2010). Os animais passaram por uma avaliação de pré-seleção no dia anterior ao teste em que foram selecionados. Os animais que se mantiveram no cilindro a 5 rpm por 1 minuto foram selecionados.

No dia do teste, os animais passaram 1 minuto em fase de habituação a 5 rpm, após a fase de habituação, iniciou-se a fase de aceleração (constituída por fase 1-2: 16 rpm; fase 3-4: 20 rpm; fase 5-6: 25 rpm; fase 7-8: 28 rpm; fase 9-10: 37 rpm). As fases são mostradas em um indicador luminoso próximo ao contador de tempo do aparato. O aparato leva 6 minutos para chegar a sua velocidade de rotação máxima, e após chegar a sua rotação máxima os animais foram mantidos por mais 1 minuto em aceleração máxima.

O tempo de teste foi de 7 minutos ou até que o animal caísse do cilindro. Toda vez que um animal se virou ao contrário, sua posição foi corrigida sem a interrupção do teste. Antes do início da sessão de teste de cada animal o aparato foi limpo com solução de etanol 10% e seco com papel toalha. O tempo de latência para a queda foi utilizado como medida para avaliação da coordenação motora dos animais.



Figura 7. Aparato utilizado no teste do Rotarod. Fonte: Insight.

4.3. AVALIAÇÃO DIRETA DE PRESSÃO ARTERIAL EM ANIMAIS ANESTESIADOS

Os animais foram submetidos à anestesia profunda permanecendo nesta maneira durante toda a experimentação. O protocolo anestésico adotado se deu através da associação de

cetamina (100 mg/ml/kg; Syntec Ltda., Brasil) e xilazina (20 mg/ml/kg; Syntec Ltda., Brasil), administrada por via intramuscular (I.M.) e suplementadas quando necessário com 30 % da dose inicial também por via I.M. Após verificar a resposta reflexa à dor, os animais foram colocados sobre uma manta aquecida (37 °C), em posição de decúbito dorsal. Em seguida, foi isolada a artéria carótida e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com auxílio de uma pinça, o fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido e com fio de sutura foi realizada uma ligadura na proximidade distal.

Utilizando uma tesoura oftálmica realizou-se um pequeno corte na região medial da artéria, servindo como via de acesso para inserção de um cateter de polietileno devidamente heparinizado (a fim de evitar a formação de coágulos e obstrução do cateter) e firmemente amarrado. Todo este aparato foi conectado a um transdutor de pressão que, por sua vez, estava acoplado a um sistema de aquisição digital de dados (PowerLab), no qual os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) (em mmHg) foram mensurados e registrados através do *software* LabChart versão 7.2 (ADI Instruments, Austrália) (fig. 8).

Ao término dos experimentos, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico, por via intraperitoneal (I.P.). Após o procedimento cirúrgico e transcorrido um período de estabilização de 20 minutos, as PAS e PAD em mmHg foram mensuradas em seus estados basais e 30 minutos após a administração de CLO 0.03 mg/kg pela via intraperitoneal.



Figura 8. Setup utilizado para avaliação de pressão arterial direta em animais anestesiados. Fonte: Acervo pessoal.

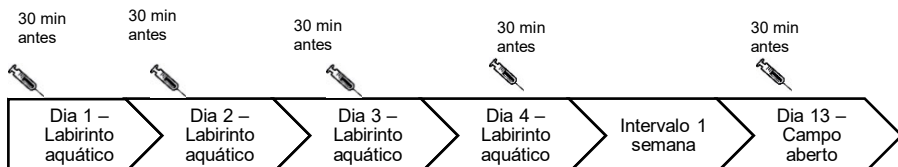
4.4. DROGAS

Cloridrato de clonidina (CLO; 0,03 e 0,01 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA) dissolvida em solução salina 0,9% e administrada sistemicamente através de injeção intraperitoneal (I.P) 30 minutos antes do início dos testes. As doses foram escolhidas de acordo com a literatura (KAWAURA et al., 2014; VAN DEN BUUSE; DE JONG, 1989; VAN DEN BUUSE; HENNEVELD; DE JONG, 1988). O regime de tratamento será descrito no próximo item.

Cloridrato de guanfacina (GUA; 0,3 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA) dissolvida em solução salina 0,9% e administrada sistemicamente através de injeção I.P 30 minutos antes do teste. A dose foi escolhida de acordo com a literatura (KAWAURA et al., 2014; LANGEN; DOST, 2011; SAGVOLDEN, 2006; TOGASHI et al., 1982). O regime de tratamento será descrito no próximo item.

4.5. DESENHO EXPERIMENTAL

4.5.1. BLOCO EXPERIMENTAL 1: CLO e GUA repetidas na memória de trabalho, emocionalidade e atividade locomotora.



O primeiro bloco experimental foi planejado para avaliar e comparar a memória de trabalho, atividade locomotora e emocionalidade nas linhagens SHR e SLA16 frente ao tratamento repetido com as drogas CLO (0.03 mg/kg) e GUA (0.3 mg/kg).

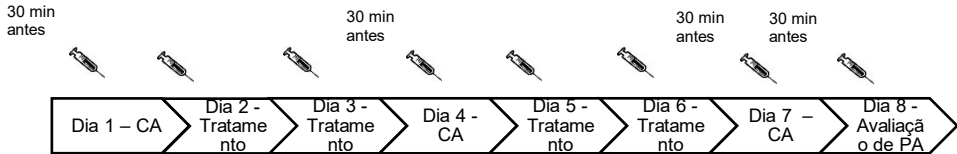
Os animais foram testados no LAM nos dias 1 a 4 (Experimento 1) das 9:00 às 15:00 horas. Uma semana após foi realizado o teste no CA (Experimento 2) às 14:00 horas.

4.5.2. BLOCO EXPERIMENTAL 2: Avaliação dos efeitos da CLO aguda na emocionalidade, atividade locomotora e pressão arterial.



O segundo bloco experimental foi planejado para investigar os efeitos agudos da CLO (0.03 mg/kg) na atividade locomotora, emocionalidade e pressão arterial. Para isso foram realizados os testes do Rotarod (Experimento 3) e de CA (Experimento 4) e no dia seguinte foi realizada a avaliação de pressão arterial (Experimento 5).

4.5.3. BLOCO EXPERIMENTAL 3: Avaliação dos efeitos de uma dose menor de CLO repetida na emocionalidade, atividade locomotora e pressão arterial.



O terceiro e último bloco experimental foi planejado para investigar os efeitos de uma dose menor de CLO (0.01 mg/kg) durante um tratamento continuado, na atividade locomotora, emocionalidade e pressão arterial. Para isso, os animais foram injetados diariamente, durante 7 dias, com CLO ou salina e foram realizados os testes de CA nos dias 1, 4 e 7 (Experimento 6). No dia 8 foi realizada a avaliação de pressão arterial (Experimento 7).

A tabela 2 resume os experimentos executados durante os 3 blocos experimentais de forma detalhada.

Tabela 2. Resumo dos experimentos executados de forma detalhada durante os 3 blocos experimentais deste trabalho.

	<i>Experimento</i>	<i>Tratamento</i>	<i>Aparato</i>	<i>Protocolo</i>
BLOCO EXPERIMENTAL 1	1	Clo 0.03 mg/kg ip, Gua 0.3 mg/kg ip Ou SAL 30 min antes do teste	Labirinto Aquático	4 dias, 4 <i>trials</i> por dia
	2	Clo 0.03 mg/kg ip, Gua 0.3 mg/kg ip Ou SAL 30 min antes do teste	Campo Aberto	5 minutos, 1 semana após o LA.
BLOCO EXPERIMENTAL 2	3	Clo 0.03 mg/kg ip Ou SAL 30 min antes do teste	Rotarod	Pré-teste de 1 min e teste com teto de 7 min
	4	Clo 0.03 mg/kg ip Ou SAL 30 min antes do teste	Campo Aberto	Após o rotarod, 5 minutos
	5	Clo 0.03 mg/kg ip	Pressão arterial	Avaliação 30 minutos após tratamento.
BLOCO EXPERIMENTAL 3	6	Clo 0.01 mg/kg ip Ou SAL 30 min antes do teste	Campo Aberto	5 minutos nos dias 1, 4 e 7.
	7	Clo 0.01 mg/kg ip	Pressão arterial	Avaliação 30 minutos após tratamento.

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos aos testes de normalidades Shapiro-Wilks e Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição normal foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias (linhagem e tratamento) nos testes de CA e Rotarod e por meio de ANOVA de medidas repetidas com três vias (linhagem, tratamento e *trial*) no LAM e no CA (linhagem, tratamento e dia). Nas avaliações de pressão arterial foi realizada ANOVA de medidas repetidas com duas vias (linhagem e tratamento como fator de repetição). Nos casos de interação, ou de efeito significativo do fator repetição foi aplicado o teste post-hoc de Duncan.

O valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M). Todos os dados foram analisados com o *software* Statística® 13 (StatSoft Inc., EUA), todos os gráficos foram gerados através do *software* GraphPad Prism®7 (GraphPad, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. BLOCO EXPERIMENTAL 1

5.1.1. EXPERIMENTO 1

No LAM, a ANOVA de medidas repetidas de 3 vias (linhagem x tratamento x trials) apontou dois efeitos significativos em relação a latência para encontrar a plataforma. Foi encontrado um efeito nos *trials* ($F(3, 198) 83,517, p=0,000001$) e em uma interação entre tratamento x *trial* ($F(6, 198)=2,2260, p<0.05$) (fig. 9 e 10). A análise do resultado relativo ao fator *trial* através do teste *post-hoc* de Duncan apontou que o primeiro *trial* diferiu dos demais (*trial 1 x trial 2* $p<0,00001$, *trial 1 x trial 3* $p=0,00001$, *trial 1 x trial 4* $p<0,000005$) mostrando uma redução do tempo de latência. O teste *post-hoc* de Duncan para a interação entre tratamento e repetição apontou uma diferença entre a CLO e SAL e entre GUA e SAL ($p=0.01$; GUA>SAL>CLO).

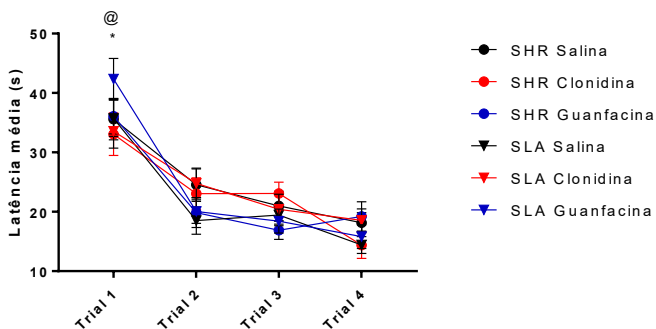


Figura 9. Latência para encontrar a plataforma no labirinto aquático em relação aos tratamentos: CLO 0.03 mg/kg, GUA 0.3 mg/kg e Salina. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. @ $p<0,05$ GUA>CLO e * $p<0.000001$ trial 1>2, 3, 4.

5.1.2. EXPERIMENTO 2

No teste de CA, a ANOVA de duas vias (linhagem x tratamento) apontou efeito significativo de linhagem, onde a SLA16 apresentou valores superiores a SHR nos parâmetros de distância total percorrida ($F(1,70) 4,09, p<0,05$) (fig. 10). Foram apontados efeitos de tratamento, onde a CLO reduziu, em ambas as linhagens, os parâmetros de distância total percorrida ($F(2,69) 13,08, p=0.00001$) (fig. 10), entradas no centro ($F(2,69) 7,86,$

$p < 0,001$) (fig. 11), distância percorrida no centro ($F(2,69)$ 10,10, $p = 0,0001$) (fig. 12), em comparação aos demais tratamentos. Não foram encontrados efeitos estatísticos em relação ao tempo no centro do campo aberto (fig. 13).

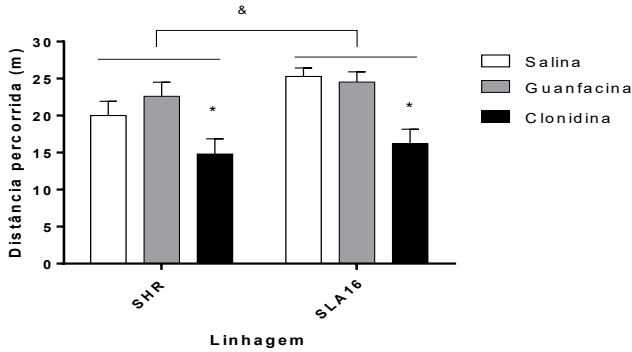


Figura 10. Distância total percorrida no Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.03 mg/kg, GUA 0,3mg/Kg e Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. & $p < 0,05$ diferença entre as linhagens SHR e SLA16, * $p < 0,00001$ diferença da CLO em comparação aos demais tratamentos.

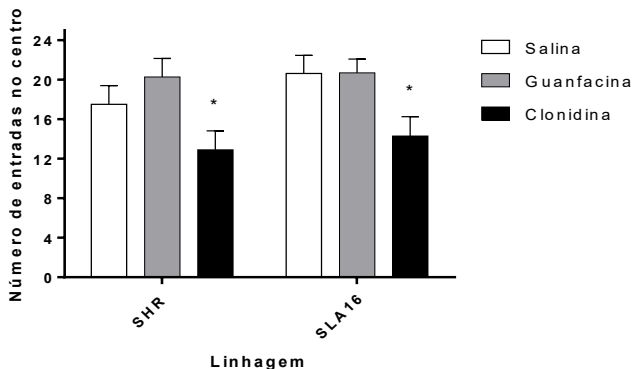


Figura 11. Número de entradas no centro do Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.03 mg/kg, GUA 0,3mg/Kg e Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p < 0,001$ diferença da CLO em comparação aos demais tratamentos.

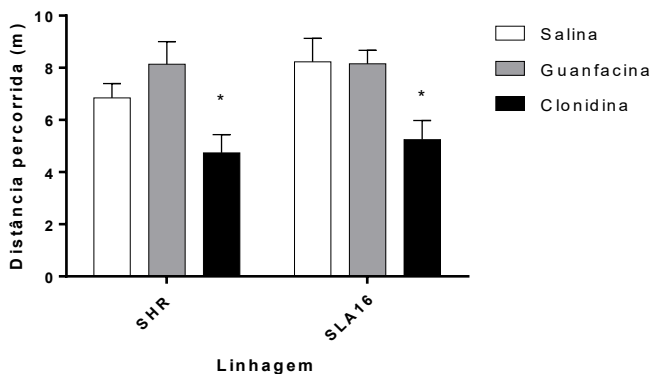


Figura 12. Distância percorrida no centro do Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.03 mg/kg, GUA 0,3mg/Kg e Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p < 0,0001$ diferença da CLO em comparação aos demais tratamentos.

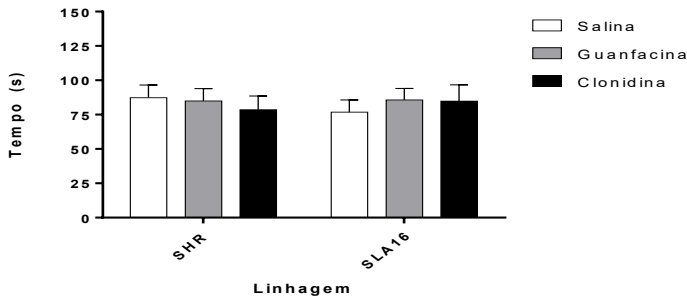


Figura 13. Tempo no centro do Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.03 mg/kg, GUA 0,3mg/Kg e Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M.

5.2. BLOCO EXPERIMENTAL 2

5.2.1. EXPERIMENTO 3

Dando início a este segundo bloco experimental, todos os animais passaram pela pré-seleção no Rotarod descrita na sessão 2.2.3 e foram selecionados para os demais testes.

No teste do Rotarod, a ANOVA de duas vias (linhagem x tratamento) apontou uma diferença de tratamento na latência de queda do Rotarod ($F(1,39) 36,41, p < 0,0000001$) (fig. 14) onde a CLO (0,03 mg/kg) reduziu a latência de queda apontando um possível prejuízo locomotor causado pelo tratamento. Não foram observadas diferenças de linhagem.

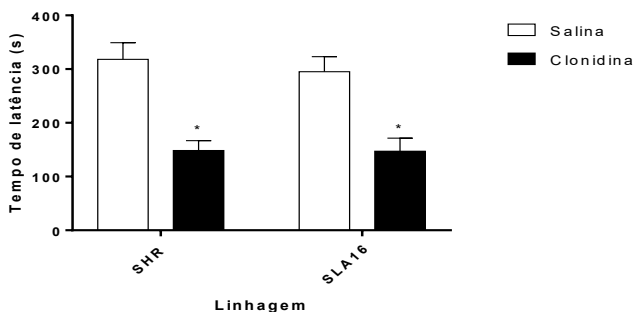


Figura 14. Tempo de latência de queda no Rotarod nas linhagens SHR e SLA16 sob influência de CLO 0.03 mg/kg e salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p=0,000001$ diferença da CLO em comparação a Salina.

5.2.2. EXPERIMENTO 4

Na avaliação aguda, no teste de CA, a ANOVA de duas vias (linhagem x tratamento) apontou efeito de linhagem, onde a SLA16 apresentou valores superiores a SHR nos parâmetros de distância total percorrida ($F(1,40)$ 4,57, $p<0,05$) (fig. 15) e na distância percorrida no centro ($F(1, 37)$ 6,98, $p=0,01$) (fig. 18). Foram apontados efeitos de tratamento, onde a CLO reduziu, em ambas as linhagens, os parâmetros de distância total percorrida ($F(1,40)$ 155,68, $p<0,00000001$) (fig. 15), entradas no centro ($F(1,37)$ 44,42, $p<0,00000001$) (fig. 16), distância percorrida no centro ($F(1, 37)$ 32,889, $p=0,000002$) (fig. 18). No parâmetro de tempo no centro ocorreu um aumento no tempo no centro associado ao tratamento ($F(1, 37)$ 10,12, $p<0,005$) (fig. 17).

Efeitos de interação entre linhagem e tratamento foram vistos no número entradas no centro ($F(1,37)$ 5,06, $p<0,05$) (fig.16), no teste *post-hoc* de Duncan foi visto que o grupo SLA16 salina apresenta maior número de entradas do que os grupos SHR salina ($p<0,01$), SHR CLO ($p<0,0001$) e SLA CLO ($p=0,00005$).

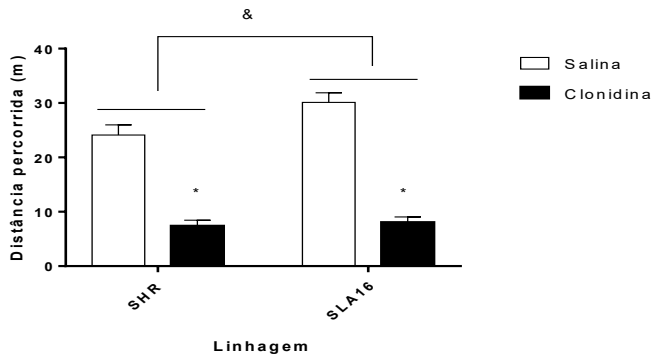


Figura 15. Distância total percorrida no Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.03 mg/kg e Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. & $p < 0,05$ diferença entre as linhagens SHR e SLA16, * $p < 0,00000001$ diferença da CLO em comparação a Salina.

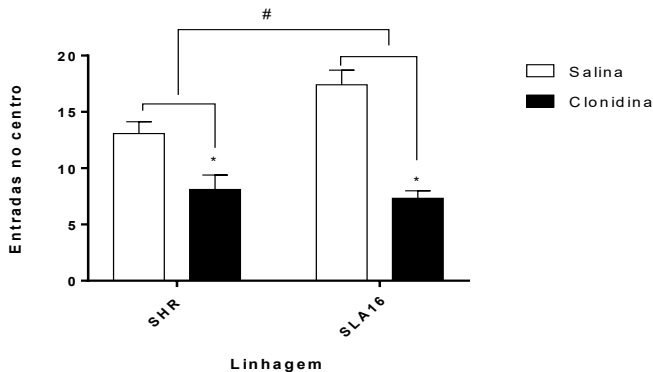


Figura 16. Número de entradas no centro do Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.03 mg/kg e Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. # $p < 0,05$ diferença na interação entre as linhagens SHR e SLA16 e os tratamentos CLO e Salina, * $p < 0,00000001$ diferença da CLO em comparação a Salina.

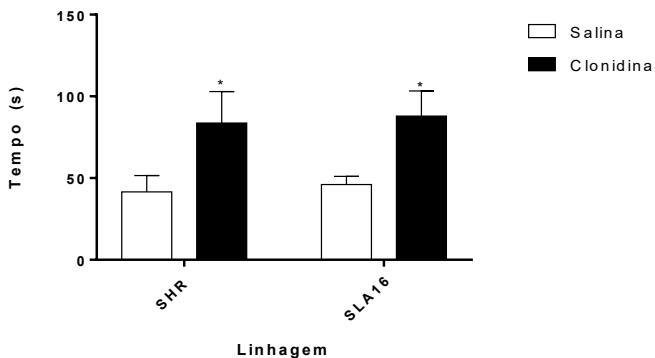


Figura 17. Tempo no centro do Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.03 mg/kg e Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p < 0,005$ diferença da CLO em comparação a Salina.

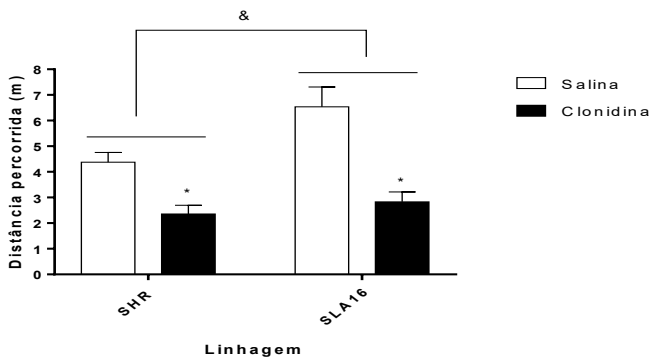


Figura 18. Distância percorrida no centro do Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.03 mg/kg e Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. & $p < 0,05$ diferença entre as linhagens SHR e SLA16, * $p < 0,000002$ diferença da CLO em comparação a Salina.

5.2.3. EXPERIMENTO 5

Na avaliação de pressão arterial a ANOVA de duas vias de medidas repetidas (linhagem x tratamento), o fator de repetição foi a comparação basal com o pós-tratamento.

Foi encontrada uma diferença significativa no fator de tratamento na pressão arterial sistólica ($F(1, 10) 33,243, p<0,0002$) (fig. 19), sendo que após a injeção de CLO a pressão de ambas as linhagens diminuiu. Foi encontrada uma diferença significativa também na pressão arterial diastólica ($F(1, 10) 39,475, p=0,0001$) também no fator de repetição, e uma tendência de efeito na interação entre linhagem e tratamento ($F(1, 10) 3,3103, p=0,09$), na qual a linhagem SLA16 teve uma redução maior na pressão arterial diastólica após o tratamento, em comparação com a linhagem SHR (fig. 20).

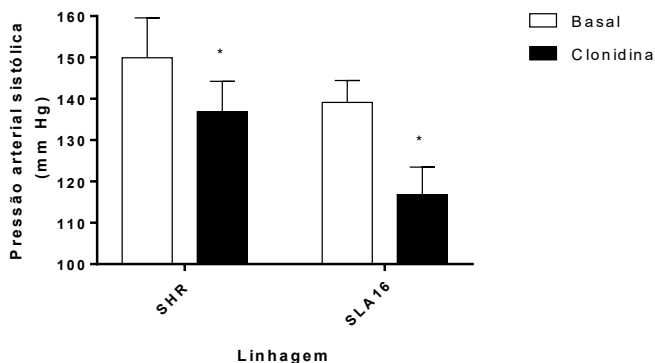


Figura 19. Avaliação da pressão arterial sistólica basal e pós tratamento com 0.03 mg/kg de CLO i.p. em fêmeas SHR e SLA16. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p<0,0002$ diferença entre a PA basal e pós-tratamento.

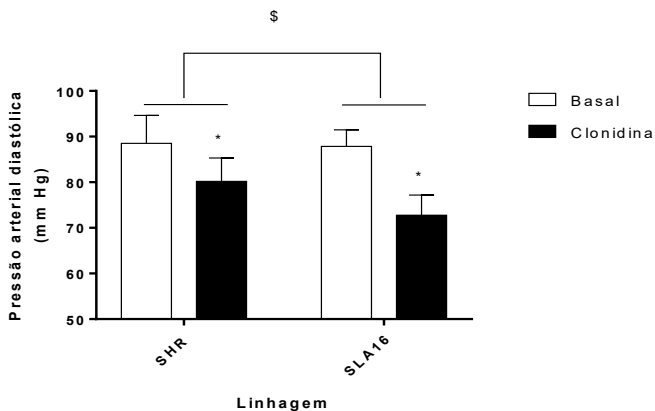


Figura 20. Avaliação da pressão arterial diastólica basal e pós tratamento com 0.03 mg/kg de CLO i.p. em fêmeas SHR e SLA16. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p < 0,0001$ diferença entre a PA basal e pós-tratamento. \$ $p = 0,09$ efeito marginal de uma interação entre linhagem e tratamento.

5.3. BLOCO EXPERIMENTAL 3

5.3.1. EXPERIMENTO 6

No teste do CA a ANOVA de medidas repetidas (linhagem, tratamento e dia) apontou efeito de linhagem, onde as ratas SLA16 apresentaram valores superiores as ratas SHR nos parâmetros de distância total percorrida ($F(1, 34) 17,71, p < 0,0001$) (fig. 21), entradas no centro ($F(1, 34) 8,2159, p < 0,01$) (fig. 22), tempo no centro ($F(1, 34) = 6,8112, p = 0,01$) (fig. 23), distância percorrida no centro ($F(1, 34) 9,8335, p < 0,005$) (fig. 24).

Também foram apontados efeitos significativos para o fator de repetição na distância total percorrida ($F(2, 68) 9,8734, p = 0,0001$) (fig.21), que através do teste *post-hoc* de Duncan mostrou uma redução na locomoção total no dia 7 em relação aos demais dias ($p = 0,006$ e $p = 0,0001$ para os dias 1 e 4, respectivamente).

Também foram encontrados resultados significativos no fator repetição em relação às entradas no centro ($F(2, 68) 17,528, p < 0,000001$) (fig. 22), o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que

todos os dias diferiram entre si, tendo uma redução sequencial nas entradas no centro do dia 1 até o dia 7.

A ANOVA também revelou um efeito no fator de repetição no tempo no centro ($F(2, 68) 21,687, p=0,00000005$) (fig. 23) o teste *post-hoc* de Duncan revelou uma diferença no primeiro dia em relação aos demais, os animais SHR apresentaram uma redução nos dias 4 e 7 e os animais SLA 16 um aumento ($p<0,0001$ e $p<0,00005$ para os dias 4 e 7, respectivamente).

A distância percorrida no centro (fig. 24) apresentou diferença no fator de repetição ($F(2, 68) 18,616, p<0,00000005$) o *post-hoc* de Duncan revelou que todos os dias diferiram entre si, apontando uma redução da distância percorrida no centro do primeiro ao sétimo dia.

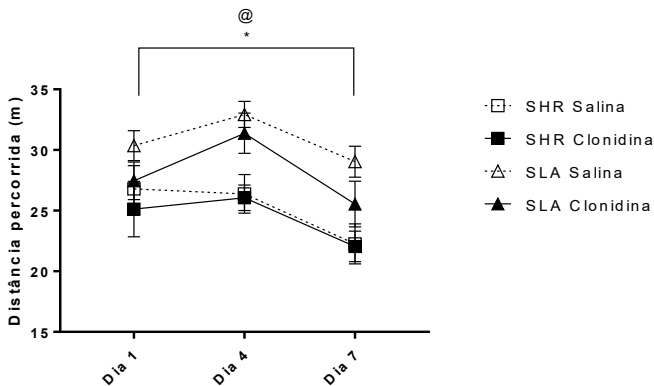


Figura 21. Distância total percorrida no Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.01 mg/kg ou Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p<0,0001$ diferença entre as linhagens, @ $p<0,0001$ diferença entre os dias.

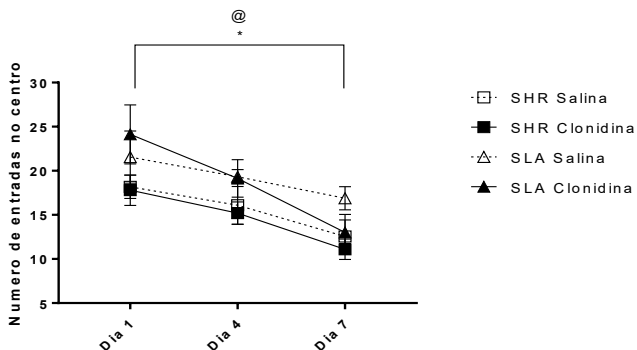


Figura 22. Número de entradas no centro do Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.01 mg/kg ou Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p < 0,01$ diferença entre as linhagens, @ $p < 0,000001$ diferença entre os dias.

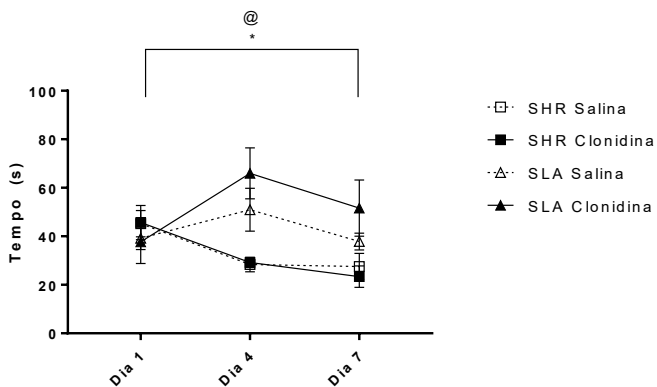


Figura 23. Tempo no centro do Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.01 mg/kg ou Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p = 0,01$ diferença entre as linhagens SLA > SHR, @ $p = 0,00000005$ diferença entre os dias.

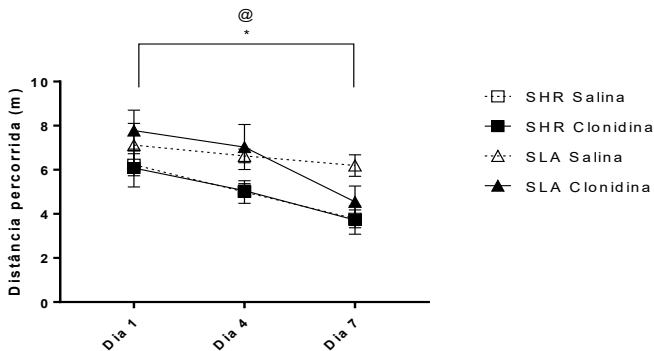


Figura 24. Distância percorrida no centro do Campo Aberto nas linhagens SHR e SLA16 sob influência dos tratamentos: CLO 0.01 mg/kg ou Salina como veículo. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p < 0,005$ diferença entre as linhagens, @ $p < 0,000005$ diferença entre os dias.

5.3.2. EXPERIMENTO 7

Através de uma ANOVA de duas vias de medidas repetidas (linhagem x tratamento), no qual o fator de repetição foi a comparação basal com o pós-tratamento, foi encontrada uma diferença significativa no fator tratamento na pressão arterial sistólica ($F(1, 10) 21,02, p < 0,001$) (fig. 25) onde após a injeção de CLO a pressão de ambas as linhagens diminuiu. Além disso, foi observada uma diferença de linhagem ($F(1, 10) 8,7736, p < 0,02$), mostrando que a pressão arterial sistólica dos animais da linhagem SLA16 foi significativamente mais baixa que a dos animais da linhagem SHR. Foi observada uma diferença significativa no fator de tratamento também na pressão arterial diastólica ($F(1, 10) 52,638, p = 0,00003$) (fig. 26), apresentando uma redução da pressão arterial diastólica após a injeção de CLO.

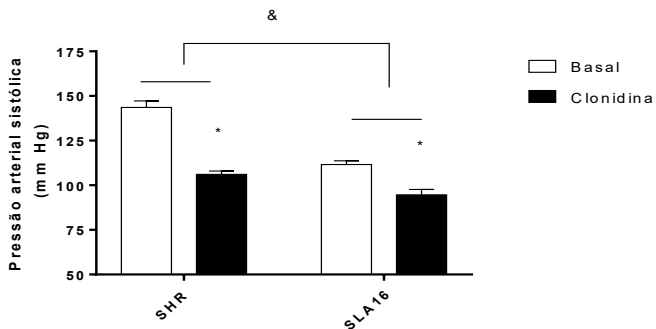


Figura 25. Avaliação da pressão arterial sistólica basal e pós tratamento com 0.01 mg/kg de CLO i.p. em fêmeas SHR e SLA16. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p < 0,001$ diferença entre a PA basal e pós-tratamento, & $p < 0,02$ diferença entre as linhagens.

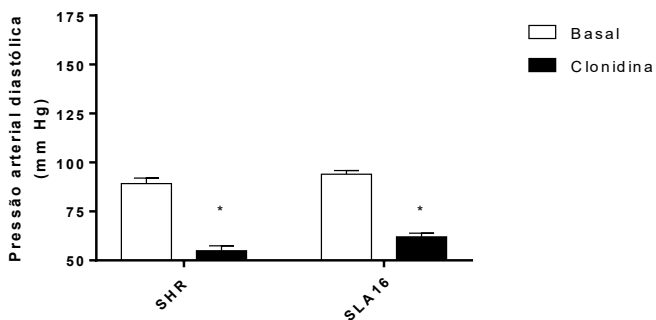


Figura 26. Avaliação da pressão arterial diastólica basal e pós tratamento com 0.01 mg/kg de CLO i.p. em fêmeas SHR e SLA16. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $p < 0,00002$ diferença entre a PA basal e pós-tratamento.

6. DISCUSSÃO

O TDAH é um transtorno de alta incidência em crianças e adolescentes, contudo, as opções de tratamento disponíveis, baseiam-se, principalmente, em psicoestimulantes. Porém, os psicoestimulantes apresentam uma série de efeitos adversos, e por essa razão as drogas α 2-adrenérgicas surgiram como uma opção de tratamento. A GUA foi o primeiro não psicoestimulante utilizado na clínica para o tratamento do TDAH sendo aprovado pelo FDA para estes fins. Assim como a GUA, a CLO teve seu uso aprovado pelo FDA para fins de tratamento do TDAH, em uso isolado ou em conjunto com psicoestimulantes (ÁLAMO; LÓPEZ-MUÑOZ, 2016; BILDER et al., 2016; DAUGHTON et al., 2012; JAMKHANDE; KHAWAJA, 2016).

A linhagem SHR é vista por muitos autores como o melhor modelo para estudos de TDAH. Sagvolden (SAGVOLDEN, 2000) propôs a validação desta linhagem, sugerindo existir validade de face (relacionada ao comportamento), e validade de constructo (é possível observar bases neurobiológicas encontradas também em humanos com TDAH, como uma baixa liberação de dopamina no CPF e uma alta concentração de noradrenalina, associada à hiperatividade e a uma disfunção nos receptores α 2A; SAGVOLDEN, 2006). A linhagem SHR apresenta um perfil hiperativo, desatento e impulsivo em comparação à linhagem usualmente utilizada como seu controle, a linhagem Wistar Kyoto (WKY), sendo ambas as linhagens descendentes da linhagem Wistar (BULL et al., 2000; LANGEN; DOST, 2011; MENESES et al., 2011; SAGVOLDEN; METZGER; SAGVOLDEN, 1993).

A linhagem SLA16 foi desenvolvida em nosso laboratório e alguns trabalhos, de nosso grupo, demonstraram que ela possui um perfil comportamental semelhante aos SHR. Entretanto, trabalhos de De Medeiros, Corvino, Corrêa, Anselmi, Granzotto, Fadanni e Squariz, demonstraram anteriormente diferenças basais em parâmetros associados à locomoção e emocionalidade no CA, onde a linhagem SLA16 apresenta maiores índices de locomoção total, central e periférica. Além disso, os machos da linhagem SLA16 apresentam comportamentos mais relacionados à emocionalidade e as fêmeas mais comportamentos associados à hiperatividade (CORRÊA, 2015; CORVINO, 2015; DE MEDEIROS et al., 2013; FADANNI, 2018; GRANZOTTO, 2016; PÉRTILE et al., 2017; SQUARIZ, 2018).

Além dos resultados relacionados ao CA, a linhagem SLA16, assim como a linhagem SHR, apresenta comportamentos prejuízos em testes comportamentais relacionados a memórias emocionais, de trabalho, de procedimento e episódicas, bem como em testes relacionados a comportamentos hedônicos e atencionais, em alguns deles apresentando piores escores que os SHR. Além disso, estudos prévios sugerem que os SLA16 possuem uma menor pressão arterial que os SHR (ANSELMINI et al., 2016; CORRÊA, 2015; CORVINO, 2015; DE MEDEIROS et al., 2013; FADANNI, 2018; GRANZOTTO, 2016; SQUARIZ, 2018).

Os aspectos comportamentais dos SLA16 parecem diferir dos SHR em relação a parâmetros associados à locomoção especialmente frente à novidade (DE MEDEIROS, 2012). Além disso, os SLA16 não apresentam diferenças na concentração de receptores D2 dopaminérgicos e no DAT em relação aos SHR (PÉRTILE et al., 2017), sugerindo uma possível hipofunção dopaminérgica como a já descrita na linhagem SHR (RUSSELL, 2011). Juntos, esses estudos levam a acreditar que a linhagem SLA16 possa ser um bom modelo de estudos para o TDAH. Além disso, este trabalho é o primeiro que busca avaliar os efeitos de drogas noradrenérgicas na linhagem SLA16.

No presente estudo, ratas das linhagens SHR e SLA16 foram comparadas em três conjuntos de experimentos para avaliar a influência de drogas α 2-adrenérgicas em comportamentos associados ao TDAH. O primeiro bloco experimental investigou possíveis diferenças na memória de trabalho, emocionalidade e locomoção dos animais. O segundo bloco foi dedicado a avaliar se o efeito hipolocomotor da CLO, encontrado no CA, dizia respeito a um efeito sedativo ou de normalização da hiperatividade. Para isso foram realizados os testes do Rotarod e CA, além da avaliação de pressão arterial destes animais. Por fim, o terceiro bloco foi destinado à investigação dos efeitos de uma dose menor da CLO em um tratamento continuado por 1 semana. Para isso foram realizadas 3 avaliações no CA, no primeiro, quarto e sétimo dia e também no Rotarod, no primeiro e sétimo dia de tratamento. Um dia após o término dos testes comportamentais foi realizada a avaliação de pressão arterial.

6.1. BLOCO EXPERIMENTAL 1

Neste primeiro bloco experimental, buscamos testar a hipótese de que as drogas α 2-adrenérgicas melhorariam a memória de trabalho, e a hiperatividade dos animais das linhagens SHR e SLA16.

No teste do LAM, em um protocolo de memória de trabalho, não foram encontradas diferenças entre as linhagens, e o tratamento com GUA aumentou a latência, enquanto a CLO reduziu a latência para encontrar a plataforma no primeiro *trial* (fig.9). Além disso, foram encontradas diferenças entre o *trial* 1 e o *trial* 2, sugerindo não haver prejuízo na memória de trabalho de ambas as linhagens.

A memória de trabalho é um tipo de memória ativa apenas por um período que se faz necessário. Um bom exemplo para a memória de trabalho é buscar um número para telefonar, esse número será lembrado durante o período em que se está utilizando o mesmo, sendo rapidamente esquecido após seu uso (GOLDMAN-RAKIC, 1995). Em animais, ela pode ser classificada como uma memória de curto prazo em relação a um determinado estímulo, testada mais de uma vez em uma sessão, mas que não pode ser vista entre sessões (DUDCHENKO, 2004).

O termo memória de trabalho tem origens em estudos com animais no começo da década de 1970, em experimentos de Olton e Honig (DUDCHENKO, 2004). Olton e Samuelson realizaram o desenvolvimento de um aparato para avaliar a memória de trabalho, o labirinto radial de oito braços. Nesse aparato viram que os animais não entravam nos braços que já haviam entrado e encontrado comida, explorando apenas os braços que não haviam visitado, mas no dia seguinte essa memória parecia não ser relevante (DUDCHENKO, 2004).

Além do labirinto radial de oito braços, outros testes são utilizados para avaliar memórias de trabalho, como protocolos de LAM, como o proposto por Steele e Morris (STEELE; MORRIS, 1999). Nesse a plataforma fica submersa e é mudada de posição a cada dia e são realizados 4 *trials* por dia, sendo a diferença no tempo de latência entre os *trials* 1 e 2 o principal fator avaliado para este tipo de memória. Além disso, pode-se definir o intervalo entre cada *trial*, para avaliar este tipo de memória.

A memória de trabalho tem como bases neurobiológicas disfunções nas monoaminas no CPF (ARNSTEN; STEERE; HUNT, 1996; GOLDMAN-RAKIC, 1995; JONES, 2002; LEVY;

FARROW, 2001). Esses prejuízos podem ser observados tanto em humanos com TDAH, quanto em animais modelo de estudo para o TDAH. Arnsten demonstrou que animais tratados com GUA apresentaram melhoras nos prejuízos de memória de trabalho causados pela ioimbina (ARNSTEN; STEERE; HUNT, 1996). Jakala e seus colaboradores mostraram que a GUA também ocasionava uma melhora na memória de trabalho de pacientes com TDAH (JÄKÄLÄ et al., 1999), entretanto, a CLO não apresentou melhoras na memória de trabalho.

Em animais da linhagem SHR existem relatos de déficits em parâmetros cognitivos associados à memória e aprendizado (LANGEN; DOST, 2011; NAKAMURA-PALACIOS et al., 1996; PAMPLONA et al., 2009; PREDIGER et al., 2005; RUSSELL, 2011; SAGVOLDEN, 2000). Porém, especificamente em relação à memória de trabalho a literatura é bastante controversa, pois alguns autores encontram diferenças (NAKAMURA-PALACIOS et al., 1996) e outros relatam não existirem déficits de memória de trabalho nos SHR (NUNES et al., 2018; ROBERTSON; CLEMENTS; WAINWRIGHT, 2008).

Jakala *et al* (JÄKÄLÄ et al., 1999) mostraram que a CLO prejudicou aspectos relacionados à memória de trabalho em humanos, uma possível explicação para isso é que a CLO diminua a taxa de disparos no LC e a liberação de noradrenalina no CPF, o que poderia ser suficiente para causar um prejuízo na memória de trabalho. Outros estudos nos quais a CLO é comparada à GUA, apontam também uma maior eficácia da GUA em relação à CLO, apontando a maior seletividade da GUA como diferencial (CINNAMON BIDWELL; DEW; KOLLINS, 2010).

Contudo, trabalhos que avaliem a influência dos agonistas α 2-adrenérgicos na memória de trabalho em animais da linhagem SHR não foram encontrados. Além disso, esta foi a primeira vez que foram avaliados os efeitos de drogas α 2-adrenérgicas na linhagem SLA16.

Neste estudo, utilizamos este protocolo com um intervalo entre *trials* curto de 30 segundos, este pequeno intervalo pode ser considerado uma limitação ao teste, pois alguns autores sugerem intervalos maiores entre cada *trial* para este tipo de memória (DUDCHENKO, 2004; LINDNER; BALCH; VANDERMAELEN, 1992; STEELE; MORRIS, 1999).

O campo aberto é um dos testes de psicologia animal mais utilizado para avaliar comportamentos relacionados à

emocionalidade, locomoção e também sedação em roedores (PRUT et al., 2003). Em aparatos como o CA, os ratos tendem a andar próximos as paredes, este comportamento é chamado de tigmotaxia (PRUT et al., 2003). Além disso, a locomoção periférica está associada a fatores não emocionais como, por exemplo, a atividade motora, enquanto a locomoção central está mais associado à emocionalidade (PRUT et al., 2003; RAMOS, 2008).

O aumento de tempo gasto na zona central e/ou da locomoção central podem indicar um efeito tipo ansiolítico, este tipo de comportamento pode ser visto através de intervenções farmacológicas, como administração de benzodiazepinas. Ou também, por fatores genéticos, como, por exemplo, os mostrados por Ramos e seus colaboradores em um estudo com seis linhagens de ratos, no qual eles demonstraram que fatores genéticos influenciam comportamentos associados à emocionalidade (PRUT et al., 2003; RAMOS et al., 1997).

A CLO reduziu a locomoção dos animais em quase todos os parâmetros, exceto no tempo no centro do CA (fig. 10,11,12). O efeito de tratamento associado à CLO encontrado no CA poderia ser interpretado como uma melhora na hiperatividade de ambas as linhagens. Ou ainda, o efeito hipolocomotor causado pela CLO poderia ser associado a efeitos sedativos por sua afinidade aos três subtipos de receptores α_2 pré-sinápticos (ARNSTEN; STEERE; HUNT, 1996). Diferentemente, a GUA possui afinidade pelos receptores α_2A pós-sinápticos e por isso não costuma apresentar efeitos sedativos associados ao seu uso (ARNSTEN; STEERE; HUNT, 1996; CINNAMON BIDWELL; DEW; KOLLINS, 2010).

Os resultados encontrados, no presente estudo, com a CLO, são corroborados na literatura por Buuse e colaboradores. Eles utilizaram a linhagem SHR e a mesma dose de 0,03 mg/kg e demonstraram um efeito dose-dependente da CLO no CA, sendo este efeito associado a uma possível sedação (VAN DEN BUUSE; HENNEVELD; DE JONG, 1988). Contudo, sabe-se que a linhagem SHR possui uma maior locomoção total no CA do que a linhagem Wistar (PANDOLFO et al., 2007).

Além disso, vimos que uma semana após a realização do LAM as fêmeas da linhagem SLA16 apresentaram uma maior locomoção total do que as fêmeas linhagem SHR (fig. 10). Essa diferença pode ser atribuída ao *locus* diferencial da linhagem SLA16, corroborando estudos prévios do nosso laboratório (DE

MEDEIROS et al., 2013; FADANNI, 2018; GRANZOTTO, 2016; RAMBORGGER, 2017; SQUARIZ, 2018).

Em suma, os resultados deste primeiro bloco experimental rejeitaram a hipótese de que as drogas α 2-adrenérgicas melhorariam a memória de trabalho nas linhagens SHR e SLA16, visto que ambas não diminuíram a latência para alcançar a plataforma no protocolo utilizado. Porém, foi encontrado um efeito hipolocomotor nos animais tratados com CLO, que poderia ser indicativo de uma melhora na hiperatividade locomotora dos animais.

Esse trabalho foi o primeiro a avaliar a memória de trabalho de fêmeas SLA16 e a testar a GUA neste protocolo em ambas as linhagens. Então, esse primeiro bloco experimental levantou a seguinte pergunta: O efeito hipolocomotor causado pela CLO no CA está associado com uma melhora da hiperatividade ou com um efeito hipotensor ou sedativo? Buscamos responder esta pergunta no segundo bloco experimental.

6.2. BLOCO EXPERIMENTAL 2

O segundo bloco experimental teve como objetivo avaliar se os efeitos hipolocomotores da CLO encontrados no CA estariam associados a um efeito sedativo ou hipotensor. Para isso, foram realizados os testes do Rotarod e de CA, após tratamento agudo seguido de avaliação de pressão arterial.

No rotarod, nós encontramos um efeito bastante robusto, o tratamento com CLO 0,03 mg/kg causou uma redução no tempo de latência para queda do cilindro em ambas as linhagens (fig. 14), sugerindo um possível efeito sedativo. O resultado encontrado neste trabalho corrobora com outros resultados encontrados no rotarod sob influência de CLO nas doses de 0,05 a 2 mg/kg (DREW; GOWER; MARRIOTT, 1979).

O teste do rotarod é um teste para avaliar a capacidade locomotora de roedores, este teste pode sofrer influência de fatores relacionados à coordenação motora, ao aprendizado e a capacidade cardiopulmonar (SHIOTSUKI et al., 2010), podendo ser também utilizado para avaliar efeitos sedativos (LU et al., 2010). Na realização do teste do rotarod, alguns animais viraram-se no cilindro e tiveram sua posição ajustada. Além disso, foi a

primeira vez que o teste do rotarod foi realizado em fêmeas da linhagem SLA16.

Além do rotarod, o CA pode também avaliar a sedação, através da redução de parâmetros locomotores como a locomoção total (PRUT et al., 2003). No primeiro bloco experimental, o teste de CA foi realizado uma semana após o LAM, sofrendo a influência do regime de tratamento utilizado para a realização do LAM. Por este motivo, uma nova avaliação no CA fez-se necessária para avaliar a influência do tratamento agudo em animais *naïve*.

Neste bloco, com um regime de tratamento agudo, vimos diferenças significativas em relação ao regime de tratamento do primeiro bloco, onde os animais receberam 4 injeções de CLO uma semana antes do CA. A redução dos índices locomotores encontrada anteriormente não foi tão acentuada como a encontrada neste segundo bloco. No segundo bloco experimental, a injeção aguda de CLO reduziu a média de locomoção total para menos de 10 metros em ambas as linhagens, enquanto no primeiro bloco essa redução foi para aproximadamente 15 metros em ambas as linhagens. Este perfil de redução em comparação ao segundo experimento foi encontrado em todos os parâmetros analisados.

Neste segundo bloco experimental, encontramos novamente diferenças de linhagem nos parâmetros de locomoção total e no centro do CA (fig. 15 e 18). Foi encontrada uma interação entre linhagem e tratamento no número de entradas no centro (fig. 16), os animais da linhagem SLA16 tiveram uma maior redução de locomoção em comparação aos animais da linhagem SHR. Diferentemente do experimento 2, neste quarto experimento foi encontrada uma diferença no tempo no centro, os animais de ambas as linhagens se mantiveram mais tempo no centro quando tratados com CLO (fig. 17). Esse resultado sugere um efeito sedativo causado pelo tratamento com CLO, corroborando os achados no rotarod.

Foram encontrados efeitos hipolocomotores em todos os parâmetros do CA (fig. 15 a 18), estes resultados corroboram dados da literatura que apontam uma redução da locomoção no CA causada pelo tratamento com CLO, sendo este um efeito sugestivo de sedação (ARNSTEN; STEERE; HUNT, 1996; VAN DEN BUUSE; DE JONG, 1989; VAN DEN BUUSE; HENNEVELD; DE JONG, 1988). Além da CLO outros agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos apresentam efeitos sedativos, como é o caso da xilazina (KITANO

et al., 2018), também existem relatos de diferenças nos efeitos da CLO dependentes de linhagem (TILSON et al., 1977).

Na avaliação de pressão arterial a clonidina causou uma redução significativa na pressão arterial sistólica e diastólica dos animais (fig. 19 e 20), este resultado corrobora a literatura clássica envolvendo o uso da CLO como agente anti-hipertensivo (ATKINSON et al., 1986; FRISK-HOLMBERG; EDLUND; PAALZOW, 1978). Além disso, foi encontrado um efeito marginal de interação entre linhagem e tratamento na pressão arterial diastólica (fig.20), onde a linhagem SLA16 apresentou uma maior redução neste parâmetro, entretanto ressaltamos, não haver diferença estatística. Este efeito marginal pode estar associado ao *locus* diferencial da linhagem SLA16, oriundo da linhagem normotensa Lewis. Esta diferença levanta também a hipótese que os animais da linhagem SLA16 poderiam ser mais sensíveis aos efeitos da CLO.

O conjunto total dos dados deste bloco experimental demonstrou um efeito sedativo associado à CLO. Além disso, foi visto também um efeito hipotensor. Ademais, foram encontrados efeitos linhagem dependente onde a linhagem SLA16 parece ser mais susceptível aos efeitos da CLO do que a linhagem SHR.

Essa aparente susceptibilidade levou a realização do terceiro e último bloco experimental, em um tratamento repetido por 1 semana com uma dose menor de CLO (0,01 mg/kg) do que a utilizada até então (0,03 mg/kg), para analisar se a hiperatividade poderia ser diminuída sem uma possível sedação.

6.3. BLOCO EXPERIMENTAL 3

A dose utilizada, neste bloco experimental, está descrita na literatura como sub efetiva nas alterações comportamentais (VAN DEN BUUSE; DE JONG, 1989; VAN DEN BUUSE; HENNEVELD; DE JONG, 1988), mas capaz de reduzir a pressão arterial dos SHR (LIN et al., 2015). Buscamos também avaliar se o tratamento repetido com CLO geraria alterações comportamentais em dias diferentes, contudo, não foram observados efeitos comportamentais associados ao tratamento em ambas às linhagens (fig. 21 a 24), bem como descrito na literatura para esta dose na linhagem SHR (VAN DEN BUUSE; DE JONG, 1989; VAN DEN BUUSE; HENNEVELD; DE JONG, 1988).

Ocorreram diferenças de linhagem em todos os parâmetros comportamentais avaliados, onde a linhagem SLA16 apresentou maiores índices locomotores do que a linhagem SHR, novamente sugerindo uma grande influência do *locus* diferencial sobre comportamentos associados à emocionalidade e locomoção (DE MEDEIROS, 2012). Em relação à locomoção total (fig. 21), os animais não parecem sofrer habituação no CA, corroborando o estudo de Granzotto, que demonstrou que os animais machos das linhagens SHR e SLA16 não sofrem habituação durante 5 dias de testes no CA. Isso sugere que as fêmeas também não sofrem habituação na locomoção total no CA, mantendo seu perfil hiperlocomotor e de menor emocionalidade (GRANZOTTO, 2016).

Diferente dos achados em machos por Granzotto onde os animais mantiveram a locomoção central durante os 5 dias (GRANZOTTO, 2016), nesse estudo com fêmeas, houve uma redução gradual dia-dependente no número de entradas no centro do CA (fig. 22) e na locomoção central (fig. 24). Entretanto, os SLA16 controle mantiveram índices mais altos do que os outros grupos nestes parâmetros, sugerindo uma menor emocionalidade desta linhagem, corroborando os estudos de De Medeiros e Anselmi (ANSELMÍ et al., 2016; DE MEDEIROS et al., 2013). Conforme já discutimos anteriormente, o centro do CA está relacionado à emocionalidade dos animais, podendo ser considerada uma região aversiva para os roedores (RAMOS et al., 2008). Contudo, a entrada em zonas aversivas pode estar relacionada com comportamentos de tomada de risco, sendo associados a comportamentos “tipo-impulsivo” (PÉRTILE et al., 2017), neste terceiro bloco, a redução gradual nas entradas no centro, pode ser sugestivo de uma melhora na impulsividade dos animais.

No oitavo e último dia deste bloco experimental os animais que receberam CLO durante os 7 dias foram submetidos a avaliação de pressão arterial. A dose de 0,01 mg/kg foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica e diastólica (fig. 25 e 26) de ambas as linhagens, corroborando com os achados de Lin e colaboradores em machos SHR (LIN et al., 2015).

Também foi encontrada uma diferença de linhagem na pressão arterial sistólica na qual a linhagem SLA16 apresentou uma menor pressão arterial do que a linhagem SHR (fig. 25). Essa redução da pressão arterial sistólica dos SLA16 pode ser devida ao tratamento continuado, na avaliação realizada neste bloco sua

pressão arterial sistólica média basal foi de 111 mmHg, enquanto na avaliação de pressão arterial realizada no segundo bloco a pressão arterial sistólica média basal foi de 139 mmHg (fig. 19). Ressaltando que a avaliação realizada no segundo bloco foi feita com animais que eram *naïve* para a CLO. Além disso, com base nos dados de pressão arterial do segundo bloco, pode-se sugerir uma maior sensibilidade a CLO na linhagem SLA16, entretanto, estudos moleculares para avaliar diferenças no sistema noradrenérgico de ambas as linhagens.

Analisados em conjunto os dados deste último bloco experimental demonstraram diferenças na pressão arterial sistólica e diastólica, contudo, não foram encontradas diferenças nos testes comportamentais, apesar dos efeitos observados na pressão arterial dos animais. Sendo assim, podemos sugerir que os efeitos hipotensores da CLO não influenciaram o comportamento dos animais. Ramos e seus colaboradores já haviam sugerido que não existe uma correlação genética entre a locomoção central no CA e a pressão arterial em uma F2 de ratos Lewis e SHR (RAMOS et al., 1998). Os dados deste bloco experimental corroboram seu estudo, sendo que os efeitos encontrados nos blocos 1 e 2 possivelmente são decorrentes de um efeito “tipo sedativo”, associado à ativação dos receptores α_2 pré-sinápticos (ARNSTEN; STEERE; HUNT, 1996).

Ressaltando ser a primeira vez na história que foram testadas drogas noradrenérgicas nos animais da linhagem.

7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro bloco experimental deste trabalho rejeitou a hipótese de que as drogas α_2 melhorariam a memória de trabalho, mas demonstrou que o regime de tratamento deste bloco experimental causou uma melhora na hiperatividade locomotora de ambas as linhagens com um brando efeito hipolocomotor.

O segundo bloco experimental sugere que o efeito hipolocomotor causado pela CLO pode estar relacionado a uma queda na pressão arterial.

O terceiro bloco experimental sugeriu que uma dose menor de CLO não foi capaz de provocar alterações comportamentais em ambas as linhagens, mas foi capaz de provocar alterações na pressão arterial, sendo a linhagem SLA16 aparentemente mais susceptível aos efeitos da CLO.

Além disso, foi observado que as ratas da linhagem SLA16 apresentam comportamentos hiperlocomotores mais pronunciados do que as ratas da linhagem SHR, além de possuírem uma memória de trabalho semelhante. Estes dados sugerem as fêmeas da linhagem SLA16 como um modelo de estudos para o TDAH. Além disso, a linhagem SLA16 apresenta diferentes respostas às drogas α_2 -adrenérgicas, que pode ser atribuída ao *locus* diferencial no cromossomo 4 da linhagem SLA16.

Neste trabalho foi testada a hipótese de que as drogas α_2 melhorariam comportamentos associados ao TDAH, nas linhagens SHR e SLA16. Como conclusão, essa hipótese foi parcialmente negada, pois não ocorreram melhoras na memória de trabalho, mas houve uma melhora nos comportamentos hiperativos com a dose de 0,03 mg/kg de CLO em tratamento repetido. Contudo, o tratamento agudo com 0,03 mg/kg de CLO causou um perfil “tipo sedativo” e o tratamento repetido com 0,01 mg/kg de CLO não foi capaz de causar alterações comportamentais. Com base nas diferenças de resposta aos fármacos α_2 -adrenérgicos entre as linhagens, sugere-se uma avaliação molecular do sistema noradrenérgico da linhagem SLA16.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLAMO, C.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. Mechanism of action of guanfacine : a postsynaptic differential approach to the treatment of attention deficit hyperactivity disorder (adhd). **Actas españolas de psiquiatría**, v. 44, n. 3, p. 107–112, 2016.

ALDRICH, T. B. PRELIMINARY REPORT ON THE ACTIVE PRINCIPLE OF THE SUPRARENAL GLAND. **American Journal of Physiology**, p. 457–461, 1901.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION APA. **DSM-V-TR Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. [s.l: s.n.].

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

ARNSTEN, A. F. T.; STEERE, J. C.; HUNT, R. D. The Contribution of α 2-Noradrenergic Mechanisms to Prefrontal Cortical Cognitive Function. **Arch Gen Psychiatry**, v. 53, p. 448–455, 1996.

ATKINSON, J. et al. CHRONIC CLONIDINE TREATMENT AND ITS WITHDRAWAL: : EFFECTS ON BLOOD PRESSURE AND CATECHOLAMINE SYNTHESIZING ENZYMES IN BRAIN-STEM NUCLEI. **European Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 97–106, 1986.

BENNETT, M. R.; SC, D. One hundred years of adrenaline : the discovery of autoreceptors. **Clinical Autonomic Research**, v. 9, p. 145–159, 1999.

BERGER, D. F.; SAGVOLDEN, T. Sex differences in operant discrimination behaviour in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 94, n. 1, p. 73–82, 1998.

BIEDERMAN, J. et al. Gender Differences in a Sample of Adults With Attention Deficit Hyperactivity Disorder. p. 13–29, 1994.

BIEDERMAN, J.; SPENCER, T. ADHD as a Noradrenergic Disorder. **Society Of Biological Psychiatry**, v. 3223, n. 1996, 1999.

BILDER, R. M. et al. Cognitive Effects of Stimulant, Guanfacine, and Combined Treatment in Child and Adolescent Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder. **Journal of America Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 55, n. 8, p. 667–673, 2016.

BOURET, S.; SARA, S. Locus coeruleus. **Scholarpedia**, v. 5, n. 3, p. 2845, 2010.

BRIAN P. RAMOS; ARNSTEN, A. F. T. Adrenergic Pharmacology and Cognition: Focus on the Prefrontal Cortex. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 10 (2), n. 1, p. 116–125, 2009.

BRUNTON LAURENCE L, RANDA HILAL-DANDAN, B. C. K. **Goodman & Gilman's 13TH Edition**. [s.l: s.n.].

BULL, E. et al. Evaluation of the spontaneously hypertensive rat as a model of attention deficit hyperactivity disorder: acquisition and performance of the DRL-60s test. **Behavioural brain research**, v. 109, n. 1, p. 27–35, 2000.

CAYE, A. et al. Treatment strategies for ADHD: an evidence-based guide to select optimal treatment. **Molecular Psychiatry**, p. 1–19, 2018.

CINNAMON BIDWELL, L.; DEW, R. E.; KOLLINS, S. H. Alpha-2 adrenergic receptors and attention-deficit/hyperactivity disorder. **Current Psychiatry Reports**, v. 12, n. 5, p. 366–373, 2010.

COLLINS, F. S.; TABAK, L. A. NIH Plans to Enhance REproducibility in Clinical Trials. **Nature**, v. 505, n. 7485, p. 612–613, 2014.

CORRÊA, F. J. **O CROMOSSOMO 4 INFLUENCIA**

COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À MEMÓRIA EM UM MODELO GENÉTICO DE RATOS. [s.l.] UFSC, 2015.

CORVINO, M. E. **Investigação da participação do receptor dopaminérgico D2 nas diferenças comportamentais, relacionadas à ansiedade/emocionalidade, das linhagens SHR e SLA16.** [s.l.] UFSC, 2015.

CURATOLO, P.; D'AGATI, E.; MOAVERO, R. The neurobiological basis of ADHD. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 36, n. 1, p. 79, 2010.

DALE, H. H.; BARGER, G. Chemical structure and sympathomimetic action of amines. **The Journal of Physiology**, v. 41, p. 19–59, 1910.

DAUGHTON, J. et al. Clonidine extended-release tablets for the treatment of ADHD. **Neuropsychiatry**, v. 2, n. 2, p. 117–123, 2012.

DE ALWIS, D. et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder subtypes and substance use and use disorders in NESARC. **Addictive Behaviors**, v. 39, n. 8, p. 1278–1285, 2014.

DE MEDEIROS, G. F. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA LINHAGEM CONGÊNICA DE RATOS SHR.LEW-Anxrr16 COMO UM NOVO MODELO GENÉTICO PARA O ESTUDO DA ANSIEDADE. 2012.

DE MEDEIROS, G. F. et al. Low-Anxiety rat phenotypes can be further reduced through genetic intervention. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

DREW, G. M.; GOWER, A. J.; MARRIOTT, A. S. A2-Adrenoceptors Mediate Clonidine-Induced Sedation in the Rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 133–141, 1979.

DUDCHENKO, P. A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 699–709, 2004.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208–9, 1957.

ELLIOTT, T. The Action of Adrenalin. **The Journal of Physiology**, v. 32, p. 401–467, 1905.

EULER, U. S. VON. A sympathomometric pressor substance in animal organ extracts. **Nature**, v. 156, p. 18–19, 1945.

FADANNI, G. P. **EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS INDUZIDOS PELA INJEÇÃO BILATERAL DE 6- HIDROXIDOPAMINA NO ESTRIADO DE RATOS DAS LINHAGENS SHR E SLA16**. [s.l.] UFSC, 2018.

FAN, X.; BRUNO, K. J.; HESS, E. J. Rodent Models of ADHD. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 273–300.

FEINSTEIN, D. L.; KALININ, S.; BRAUN, D. Causes, consequences, and cures for neuroinflammation mediated via the locus coeruleus: noradrenergic signaling system. **Journal of neurochemistry**, v. 139, p. 154–178, 2016.

FRANOWICZ, J. S. et al. Mutation of the alpha2A-adrenoceptor impairs working memory performance and annuls cognitive enhancement by guanfacine. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 19, p. 8771–8777, 2002.

FRISK-HOLMBERG, M.; EDLUND, P. O.; PAALZOW, L. Pharmacokinetics of clonidine and its relation to the hypotensive effect in patients. **British journal of clinical pharmacology**, v. 6, n. 3 PG-227–32, p. 227–232, 1978.

FUXE, K. J. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM III. THE MONOAMINE NERVE TERMINAL. **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 596, p. 573–596, 1965.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Cellular basis of working memory. **Neuron**, v. 14, n. 3, p. 477–485, 1995.

GORMLEY, L.; TURNER, A.; FREELAND, K. Clonidine and guanfacine IR vs ER: Old drugs with “new” formulations. **Mental Health Clinician**, v. 4, n. 1, p. 22–26, 23 jan. 2014.

GRANZOTTO, N. **EFEITOS FARMACOGENÉTICOS DO TRATAMENTO COM CAFEÍNA EM RATOS ISOGÊNICOS SHR E SLA16**. [s.l.] UFSC, 2016.

HALL, C. S. Emotional Behavior in the Rat. **Journal of comparative psychology**, v. 18, p. 385–403, 1934.

HERVAS, A. et al. Efficacy and safety of extended-release guanfacine hydrochloride in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: A randomized, controlled, Phase III trial. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 12, p. 1861–1872, 2014.

JÄKÄLÄ, P. et al. Guanfacine, but not clonidine, improves planning and working memory performance in humans. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 5, p. 460–470, 1999.

JAMKHANDE, P.; KHAWAJA, A. Role of norepinephrine reuptake inhibitors in attention deficit hyperactivity disorder: A mechanism-based short review. **International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases**, v. 6, n. 4, p. 146, 2016.

JEW, C. P. et al. mGluR5 Ablation in Cortical Glutamatergic Neurons Increases Novelty-Induced Locomotion. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

JONES, M. W. A comparative review of rodent prefrontal cortex and working memory. **Current molecular medicine**, v. 2, n. 7, p. 639–647, 2002.

KAWAURA, K. et al. Stimulation of postsynapse adrenergic α 2A receptor improves attention/cognition performance in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 270, p. 349–356, 2014.

KELLY, B. D. Attention-deficit hyperactivity disorder: a clinical review of the concept, diagnosis and management. **Irish Journal**

of Psychological Medicine, v. 35, n. 03, p. 157–161, 2018.

KIM, P. et al. A simple behavioral paradigm to measure impulsive behavior in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) of the spontaneously hypertensive rats. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 125–131, 2012.

KITANO, T. et al. The α 2A-adrenoceptor subtype plays a key role in the analgesic and sedative effects of xylazine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, n. September, p. 1–5, 2018.

KNARDAHL, S.; SAGVOLDEN, T. Regarding hyperactivity of the SHR in the open-field test. **Behavioral and Neural Biology**, v. 32, n. 2, p. 274–275, 1981.

KOKRAS, N. et al. Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 436–445, 2012.

LANGE, K. W. et al. The history of attention deficit hyperactivity disorder. **ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders**, v. 2, n. 4, p. 241–255, 2010.

LANGEN, B.; DOST, R. Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animal models: Effect of dopamine D1 and alpha2 agonists. **ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders**, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2011.

LEAHY, L. G. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Historical Review (1775 to Present). **Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services**, v. 55, n. 9, p. 10–16, 2017.

LEVY, F.; FARROW, M. Working Memory in ADHD prefrontal parietal.pdf. **Current Drug Targets**, v. 2, p. 347–352, 2001.

LIN, L. L. et al. Long-term treatment of clonidine, atenolol, amlodipine and dihydrochlorothiazide, but not enalapril, impairs the sexual function in male spontaneously hypertensive rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2015.

LINDNER, M. D.; BALCH, A. H.; VANDERMAELEN, C. P. Short forms of the “reference-” and “working-memory” Morris water maze for assessing age-related deficits. **Behavioral and Neural Biology**, v. 58, n. 2, p. 94–102, 1992.

LIU, L. et al. Deficiency of Sustained Attention in ADHD and Its Potential Genetic Contributor MAOA. **Journal of Attention Disorders**, v. 22, n. 9, p. 878–885, 2018.

LU, R. et al. Enhanced Hypotensive, Bradycardic, and Hypnotic Responses to 2-Adrenergic Agonists in Spinophilin-Null Mice Are Accompanied by Increased G Protein Coupling to the 2A-Adrenergic Receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 78, n. 2, p. 279–286, 2010.

MAHONE, E. M.; DENCKLA, M. B. Attention-deficit/hyperactivity disorder: A historical neuropsychological perspective. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 23, n. 9- 10 Special Issue, p. 916–929, 2017.

MATHAI, D. S. et al. Guanfacine Attenuates Adverse Effects of Dronabinol (THC) on Working Memory in Adolescent-Onset Heavy Cannabis Users: A Pilot Study. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, p. appi.neuropsych, 2017.

MCCRACKEN, J. T. et al. Combined Stimulant and Guanfacine Administration in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Controlled, Comparative Study. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 55, n. 8, p. 657- 666.e1, 2016.

MCCULLOUGH, L. D. et al. NIH initiative to balance sex of animals in preclinical studies: Generative questions to guide policy, implementation, and metrics. **Biology of Sex Differences**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2014.

MENESES, A. et al. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: A short overview. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, n. 3, p. 365–371, 2011.

MIYOSHI, E. et al. Impaired learning in a spatial working memory

version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Research Bulletin**, v. 58, n. 1, p. 41–47, 2002.

MORRIS, R. G. M. Spatial Localization Does Not Require Local Cues. **Learning and Motivation**, v. 260, p. 239–260, 1981.

MORRIS, R. G. M. G. M. M. et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, n. 5868, p. 681–683, 24 jun. 1982.

MOSER, M.-B. et al. Component analyses differentiate between exploratory behaviour of spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats in a two compartment free exploration open field. **Scandinavian Journal of Psychology**, v. 29, n. 3–4, p. 200–206, 1988.

MUSACCHIO, J. M. Enzymes Involved in the Biosynthesis and Degradation of Catecholamines. In: IVERSEN, L. L.; IVERSEN, S. D.; SNYDER, S. H. (Eds.). . **Handbook of Psychopharmacology Volume 3 Biochemistry of Biogenic Amines**. NEW YORK AND WNDON: Springer, Boston, MA, 1975. p. 1–35.

NAKAMURA-PALACIOS, E. M. et al. Deficits of spatial learning and working memory in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**, v. 74, n. 1–2, p. 217–221, 1996.

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

NUNES, F. et al. Differential Behavioral and Biochemical Responses to Caffeine in Male and Female Rats from a Validated Model of Attention Deficit and Hyperactivity Disorder. **Molecular Neurobiology**, p. 8486–8498, 2018.

OADES, R. D. et al. The control of responsiveness in ADHD by catecholamines: Evidence for dopaminergic, noradrenergic and interactive roles. **Developmental Science**, v. 8, n. 2, p. 122–131, 2005.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a Strain of

Spontaneously Hypertensive Rats. **Japanese Circulation Journal**, v. 27, n. March, 1963, p. 282–293, 1963.

OLIVER, G.; SCHAFER, E. A. The Physiological Effects of Extracts of the Suprarenal Capsules. **The Journal of Physiology**, v. 18, n. 3, p. 230–276, 1895.

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

PANDOLFO, P. et al. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. **European Journal of Pharmacology**, v. 563, n. 1–3, p. 141–148, 2007.

PANDOLFO, P. **Papel dos receptores da adenosina em um modelo animal do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade**. [s.l.] UFSC, 2010.

PARASCANDOLA, J. Pioneers and Milestones. **The ALLERGY ARCHIVESARCHIVES**, n. February, 2010.

PERRY, R. J. et al. HHS Public Effects of d-Methylphenidate, Guanfacine, and Their Combination on Electroencephalogram Resting State Spectral Power in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. v. 510, n. 7503, p. 84–91, 2015.

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

PREDIGER, R. D. S. et al. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) - The spontaneously hypertensive rat (SHR). **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 8, n. 4, p. 583–594, 2005.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R. N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**, v. 159, n. 2, p. 197–205, 2005.

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

PURPER-OUAKIL, D. et al. Neurobiology of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. **Pediatr Res**, v. 69, n. 5, p. 69–76, 2011.

RAMBORGER, P. A. **FÊMEAS DAS LINHAGENS SHR E SLA16: UM MODELO GENÉTICO PARA O ESTUDO DOS EFEITOS DO ETANOL**. [s.l.] UFSC, 2017.

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

RAMOS, A. et al. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. **Behavioural Brain Research**, v. 96, n. 1–2, p. 195–205, 1998.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 10, p. 493–498, 2008.

RAMOS, A. et al. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. **Behavioural Brain Research**, v. 193, n. 2, p. 277–288, 2008.

RANG, H. P. et al. Rang e Dale: farmacologia. p. 1939, 2016.
ROBERTSON, B. A.; CLEMENTS, K. M.; WAINWRIGHT, P. E. The working memory capabilities of the spontaneously hypertensive rat. **Physiology and Behavior**, v. 94, n. 3, p. 481–486, 2008.

RUGGIERO, S. et al. **Guanfacine for attention deficit and hyperactivity disorder in pediatrics: A systematic review and meta-analysis** *European Neuropsychopharmacology*, 2014.

RUSSELL, V. A. Reprint of "Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder". **Journal of Neuroscience Methods**, v. 166, n. 2, 2007.

RUSSELL, V. A. Overview of animal models of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Current Protocols in Neuroscience**, n. SUPPL.54, p. 1–25, 2011.

RUSSELL, V. A.; SAGVOLDEN, T.; JOHANSEN, E. B. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioral and brain functions : BBF**, v. 1, p. 9, 2005.

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

SAGVOLDEN, T. The alpha-2A adrenoceptor agonist guanfacine improves sustained attention and reduces overactivity and impulsiveness in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). **Behav Brain Funct**, v. 2, p. 41, 2006.

SAGVOLDEN, T.; JOHANSEN, E. B. Rat Models of ADHD. In: STANFORD, C.; TANNOCK, R. (Eds.). **Behavioral Neuroscience of Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Its Treatment. Current Topics in Behavioral Neurosciences, vol 9**. [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. v. 11p. 301–315.

SAGVOLDEN, T.; METZGER, M. A.; SAGVOLDEN, G. Frequent reward eliminates differences in activity between hyperkinetic rats and controls. **Behavioral and Neural Biology**, v. 59, n. 3, p. 225–229, 1993.

SCHWARZ, L. A.; LUO, L. Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. R1051–R1056, 2015.

SHAH, K.; MCCORMACK, C. E.; BRADBURY, N. A. Do you know the sex of your cells? **AJP: Cell Physiology**, v. 306, n. 1, p. C3–C18, 2014.

SHIOTSUKI, H. et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 189, n. 2, p. 180–185, 2010.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 229, n. 1, p. 289–300, 2012.

SIRVIO, J. et al. The effects of guanfacine, alpha-2 agonist, on the performance of young and aged rats in spatial navigation task. **Behav Neural Biol**, v. 56, n. 1, p. 101–107, 1991.

SQUARIZ, J. C. DE O. **INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO METILFENIDATO EM UM MODELO GENÉTICO RELACIONADO A ENDOFENÓTIPOS DO TDAH.** [s.l.] UFSC, 2018.

STEELE, R. J.; MORRIS, R. G. M. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. **Hippocampus**, v. 9, n. 2, p. 118–136, 1999.

STILL, G. F. Goulstonian Lectures on Some Abnormal Psychological Conditions In Children. **Lancet**, p. 1163–1168, 1902.

TERRY, A. V. et al. Alpha 2A adrenergic receptor agonist, guanfacine, attenuates cocaine-related impairments of inhibitory response control and working memory in animal models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 126, p. 63–72, 2014.

THAPAR, A.; COOPER, M. Attention deficit hyperactivity disorder. **The Lancet**, v. 387, n. 10024, p. 1240–1250, 2016.

TILSON, H. A. et al. Behavioral suppressant effects of clonidine in strains of normotensive and hypertensive rats. **European**

Journal of Pharmacology, v. 43, p. 99–105, 1977.

TOGASHI, H. et al. Effects of clonidine and guanfacine on drinking and ambulation in spontaneously hypertensive rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 17, n. 3, p. 519–522, 1982.

VAN DEN BUUSE, M.; DE JONG, W. Differential effects of dopaminergic drugs on open-field behavior of spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar-Kyoto rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 248, n. 3, p. 1189–96, 1989.

VAN DEN BUUSE, M.; HENNEVELD, H.; DE JONG, W. Naltrexone and the behavioural action of clonidine in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, n. 4, p. 298–300, 1988.

VOGT, M. The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs. **The Journal of Physiology**, p. 451–481, 1954.