

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

**Muiara Aparecida Moraes**

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO PÓS-NATAL E PRÉ-PÚBERE DE AGONISTAS  
DOPAMINÉRGICOS SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS JOVENS

Belo Horizonte

2019

Muiara Aparecida Moraes

Efeitos da administração pós-natal e pré-púbere de agonistas dopaminérgicos sobre o comportamento de camundongos jovens

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora

**Orientador:** Prof. Bruno Rezende de Souza  
**Coorientador:** Prof. Fabrício Araújo Moreira

Belo Horizonte

2019

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

Moraes, Muiara Aparecida

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO PÓS-NATAL E PRÉ-PÚBERE DE AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS JOVENS [manuscrito] / Muiara Aparecida Moraes. - 2019.

100 p. : il.

Orientador: Bruno Rezende de Souza.  
Coorientador: Fabrício Araújo Moreira.

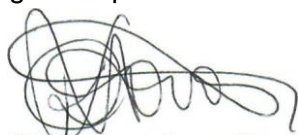
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1.dopamina. 2.neurodesenvolvimento. 3.comportamento. 4.neurofisiologia. I.Souza, Bruno Rezende de . II.Moreira, Fabrício Araújo. III.Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV.Título.

**"EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO PÓS-NATAL E PRÉ-  
PÚBERE DE L-DOPA SOBRE O COMPORTAMENTO  
DE CAMUNDONGOS JOVENS"**

**MUIARA APARECIDA MORAES**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **23 de agosto de 2019**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROF. DR. KAREN CECÍLIA DE LIMA TORRES NAVARRO**  
UNIFENAS – BH



**PROF. DR. RODRIGO CUNHA ALVIM DE MENEZES**  
UFOP

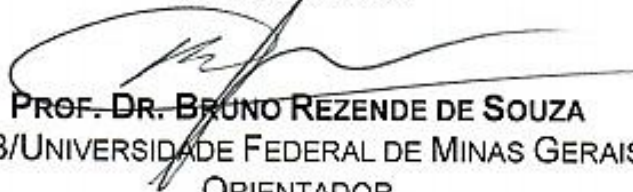


**PROF. DR. VINICIUS DE TOLEDO RIBAS**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROF. DR. LUCIENE BRUNO VIEIRA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**PROF. DR. FABRÍCIO DE ARAUJO MOREIRA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COORDENADOR



**PROF. DR. BRUNO REZENDE DE SOUZA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 23 de agosto de 2019**

## AGRADECIMENTOS

O doutorado foi minha primeira “imersão oficial” no universo das neurociências. Um sonho antigo, que demorou um pouquinho pra começar... A primeira vez que me lembro de ter definido meu ideal de vida foi aos seis anos. A professora fez a clássica pergunta “O que você quer ser quando crescer?” Eu não sabia o nome do que queria ser, mas naquela época as palavras não costumavam me faltar, e eu expliquei que queria “estudar e trabalhar pra entender como as coisas funcionam e ajudar as pessoas”. A professora respondeu: “Acho que você vai ser cientista!”. Considerando que isso aconteceu em 1989 numa escolinha primária municipal de uma cidadezinha do interior, posso dizer que foi uma resposta muito sábia. E a professora nem imagina como mudou minha vida. Eu nem sabia o que era um cientista, mas já queria ser uma. Então, meu primeiro agradecimento vai pra... Tia Carmen!

Bem antes da Tia Carmen “definir meu destino”, mas bem antes mesmo, meus pais me conceberam com esse DNA curioso e inquieto. E alimentaram minha curiosidade, incentivaram minha busca por conhecimento... Vocês são a razão de tudo, minha inspiração, minha fonte de força... Obrigada por todo o apoio, por rir e chorar comigo. Não importa o que aconteça, meu mundo sempre caberá no seu abraço.

Aos meus irmãos Iramaia e Yansey, obrigada por me permitirem ter uma infância cheia de brincadeiras, brigas e companheirismo, como toda boa infância deve ser. E um agradecimento especial a você, minha irmã, pelas madrugadas insones cuidando de mim nas minhas crises de enxaqueca, pelas palavras de incentivo e carinho.

Bom... eu achava que ser cientista e casar eram coisas mutuamente excludentes. Mas daí me casei com outro aspirante a cientista e deu tudo certo! Nenhuma expressão clichê faz jus ao amor, à amizade, ao companheirismo e à compreensão que dividimos. Obrigada White! Amo você!

E esse doutorado ampliou bastante meu repertório de humanos queridos!

A começar pelo orientador... Bruno, você sempre terá minha gratidão e admiração. Não apenas por desempenhar tão bem seu papel de orientador e professor, mas principalmente por ser tão generoso e compreensivo. Obrigada por aceitar orientar essa criaturinha ansiosa e ligeiramente antissocial!

E Fabrício: obrigada por aceitar fazer parte desse projeto. Você é mais um “cientista e professor modelo” que tive a honra de conhecer.

Aos professores do NNC, André, Grace, Juliana, Márcio e Cleiton, agradeço por todo o conhecimento compartilhado. Vocês serão sempre exemplos pra mim...

Laila e Bruna: vocês foram as melhores ICs do mundo!!! Minha dívida de chocolate será eterna! Quantos finais de semana e feriados passamos juntas... Muito obrigada por serem tão dedicadas, pacientes e competentes! Meu carinho por vocês é maior que a dívida de chocolate!

Bia: preciso escrever que você me abandonou, mas eu adoro você, pessoinha! Obrigada por estar sempre disposta a ajudar! Ana Luíza, Paula e Gisele: obrigada pelo apoio e pelas conversas divertidas.

A todos os membros do NNC, meu sincero agradecimento por terem me recebido e acolhido tão bem. Em qualquer dúvida sempre havia alguém disposto a ajudar... Foi uma honra fazer parte dessa família! E agradeço em especial ao Daniel e ao Flávio, pelas horas e horas na ressonância magnética. À Luciana Melo, que me ensinou muitas coisas científicas e alguns xingamentos engraçados também... E à Laura: a colombiana mais simpática e sincera do mundo, que saiu de Bucaramanga – o local que tem o maior cânion do mundo (segundo ela) – pra alegrar nossos dias em Belo Horizonte!

Agradeço, finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para que essa conquista fosse possível, e às agências de fomento pelo suporte financeiro.

## RESUMO

As vias de sinalização dopaminérgicas modulam um amplo leque de funções vitais do sistema nervoso, entre as quais estão o comportamento motor, a memória, atenção, aprendizado, aspectos afetivos e de recompensa. Estudos têm, cada vez mais, constatado o envolvimento da sinalização dopaminérgica na etiologia de diversos transtornos neuropsiquiátricos, bem como sua importância para o desenvolvimento morfofisiológico do cérebro. Já foi demonstrado que a dopamina (DA) tem papel fundamental na formação, amadurecimento e funcionalidade fisiológica do sistema nervoso central, e que há janelas desenvolvimentais nas quais um desbalanço deste neurotransmissor pode levar à alterações em cadeia, que culminam com a manifestação de patologias com alto grau de disfuncionalidade. Patologias como a esquizofrenia, depressão e o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade estão associados tanto com alterações na sinalização dopaminérgica quanto da morfologia do cérebro. São patologias que refletem alterações desenvolvimentais que levaram à formação de circuitos disfuncionais. Mas, em que ponto exato do desenvolvimento estas alterações começaram? Qual fator determina o grau de comprometimento e por que algumas janelas temporais são tão críticas para a susceptibilidade a danos permanentes? Diante destas e outras questões, a proposta deste trabalho é analisar os reflexos do aumento do tônus dopaminérgico durante o período perinatal (cinco primeiros dias de vida), em que ocorre intensa sinaptogênese. A sobrecarga de DA nos cinco primeiros dias de vida, quando os circuitos neurais ainda estão em formação, poderá causar alterações moleculares que serão refletidas no comportamento do animal aos 30 dias. Os resultados mostraram que embora tenham apresentado maior resiliência às alterações comportamentais, as fêmeas que receberam o agonista D1 SKF 38393 no período pós-natal apresentaram redução na arborização neural do hipocampo. A administração aguda de L-Dopa, quinpirole e SKF 38393 aos 30 dias de vida altera o comportamento locomotor e exploratório das fêmeas, além de levar à manifestação de comportamentos tipo ansioso e depressivo em fêmeas e machos. A administração de L-Dopa nos cinco primeiros dias de vida é capaz de potencializar alguns dos fenótipos comportamentais causados pelo desafio dopaminérgico, mas não todos, o que sugere que algumas das alterações induzidas pelo aumento do tônus pós-natal podem ser revertidas antes da puberdade.

Palavras chave: dopamina, neurodesenvolvimento, comportamento animal

## ABSTRACT

The dopaminergic signaling pathways modulate a wide range of vital functions of the nervous system, among which are motor behavior, memory, attention, learning, affective aspects and reward. Studies have increasingly found the involvement of dopaminergic signaling in the etiology of various neuropsychiatric disorders, as well as its importance for the morphophysiological development of the brain. It has already been shown that dopamine (DA) plays a fundamental role in the formation, maturation and physiological function of the central nervous system, and that there are developmental windows in which an imbalance of this neurotransmitter can lead to changes in the brain, culminating in the manifestation of pathologies with a high degree of dysfunctionality. Pathologies such as schizophrenia, depression, and attention deficit hyperactivity disorder are associated with both changes in dopaminergic signaling and brain morphology. These are pathologies that reflect developmental changes that led to the formation of dysfunctional circuits. But at what exact point of development have these changes begun? Which factor determines the degree of impairment and why are some time windows so critical for susceptibility to permanent damage? In view of these and other questions, the purpose of this study is to analyze the reflexes of increased dopaminergic tonus during the perinatal period (five first days of life), in which there is intense synaptogenesis. The DA overload in the first five days of life, when the neural circuits are still in formation, may cause molecular changes that will be reflected in the behavior of the animal at 30 days. The results showed that although they showed a higher resilience to the behavioral changes, the females that received the D1 agonist SKF 38393 in the postnatal period presented reduction in the hippocampal neural arborization. The acute administration of L-Dopa, quinpirole and SKF 38393 at 30 days of life alters the locomotor and exploratory behavior of females, besides leading to the manifestation of anxious and depressive behaviors in females and males. The administration of L-Dopa in the first five days of life is capable of potentializing some of the behavioral phenotypes caused by the dopaminergic challenge, but not all of them, suggesting that some of the changes induced by the increase in the postnatal tone can be reversed before puberty .

Keywords: dopamine, neurodevelopment, animal behavior



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Circuitos dopaminérgicos no cérebro humano. ....  | 15 |
| <b>Figura 2:</b> Posições e projeções axonais dos diferentes grupos de células dopaminérgicos em visão sagital do cérebro de roedores adultos. ....  | 15 |
| <b>Figura 3:</b> Sinalização sináptica dopaminérgica. ....   | 16 |
| <b>Figura 4:</b> Estrutura e distribuição dos receptores dopaminérgicos no sistema nervoso central. ....   | 17 |
| <b>Figura 5:</b> Principais eventos do desenvolvimento cerebral humano. ....   | 18 |
| <b>Figura 6:</b> Linha do tempo dos processos de desenvolvimento no sistema nervoso de ratos comparados ao momento da fertilização, organogênese e histogênese. ....                                 | 19 |
| <b>Figura 7:</b> Resumo das diferenças entre o prosencéfalo ventral (A) e dorsal (B) em relação à expressão de mRNA dos receptores de DA em camundongos. ....  | 25 |
| <b>Figura 8:</b> Marcação de neonatos. ....  | 29 |
| <b>Figura 9:</b> Esquema do procedimento experimental. ....  | 29 |
| <b>Figura 10:</b> Coletânea de imagens do processo de análise do método de Golgi-Cox. ....   | 33 |
| <b>Figura 11:</b> Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. ....            | 35 |
| <b>Figura 12:</b> Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal no teste da caixa de atividades em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. ....                  | 37 |
| <b>Figura 13:</b> Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal no teste do nado forçado em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. ....                         | 40 |
| <b>Figura 14:</b> Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal no teste do nado forçado em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. ....                         | 41 |
| <b>Figura 15:</b> Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal no teste de neofagia em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. ....                             | 42 |
| <b>Figura 16:</b> Administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal não altera o volume hipocampal de camundongos machos e fêmeas pré-púberes. ....                              | 44 |
| <b>Figura 17:</b> Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal na arborização dendrítica do hipocampo de camundongos machos pré-púberes. ....                    | 45 |
| <b>Figura 18:</b> Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal na arborização dendrítica do hipocampo de camundongos fêmeas pré-púberes. ....                    | 46 |
| <b>Figura 19:</b> Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal na formação de espinhas dendríticas no hipocampo de camundongos fêmeas e machos pré-púberes. .... | 47 |
| <b>Figura 20:</b> Resumo dos resultados obtidos nos testes comportamentais. ....   | 52 |
| <b>Figura 21:</b> Esquema do procedimento experimental. ....   | 57 |
| <b>Figura 22:</b> Efeitos do aumento agudo do tônus dopaminérgico em camundongos machos e fêmeas pré-púberes no teste do labirinto em cruz elevado. ....   | 60 |
| <b>Figura 23:</b> Efeitos da administração aguda de agonistas dopaminérgicos em camundongos machos e fêmeas pré-púberes no teste da caixa de atividades. ....  | 62 |
| <b>Figura 24:</b> Efeitos da administração aguda de agonistas dopaminérgicos no teste do nado forçado em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. ....   | 64 |
| <b>Figura 25:</b> Efeitos da administração aguda de agonistas dopaminérgicos no teste do nado forçado em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. ....   | 65 |
| <b>Figura 26:</b> Resumo dos resultados obtidos nos testes comportamentais. ....   | 69 |
| <b>Figura 27:</b> Esquema do procedimento experimental. ....   | 73 |
| <b>Figura 28:</b> Efeitos no teste do labirinto em cruz elevado do aumento agudo do tônus dopaminérgico em camundongos machos e fêmeas pré-púberes que receberam L-Dopa no período pós-natal. ....   | 75 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 29:</b> Efeitos no teste da caixa de atividades do aumento agudo do tônus dopaminérgico em camundongos machos e fêmeas pré-púberes que receberam L-Dopa no período pós-natal. .... | 77 |
| <b>Figura 30:</b> Efeitos no teste do nado forçado do aumento agudo do tônus dopaminérgico em camundongos machos e fêmeas pré-púberes que receberam L-Dopa no período pós-natal. ....        | 79 |
| <b>Figura 31:</b> Efeitos no teste do nado forçado do aumento agudo do tônus dopaminérgico em camundongos machos e fêmeas pré-púberes que receberam L-Dopa no período pós-natal. ....        | 80 |
| <b>Figura 32:</b> Resumo dos resultados de atividade locomotora. ....  | 82 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

AADC: descarboxilase de ácido aromático  
AC: adenilil ciclase  
AKT - Proteína Kinase B  
AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
CA: teste da caixa de atividades  
COMT: catecol-O-metil-transferase  
DA: dopamina  
DARPP-32 - Fosfoproteína Regulada por Dopamina de 32 kD  
DAT: transportador de dopamina  
DNA: ácido desoxiribonucleico  
DOPAC: ácido di-hidroxifenilacético  
GABA: ácido gama-aminobutírico  
GP: globo pálido  
HVA: ácido homovanílico  
LCE: teste do labirinto em cruz elevado  
L-Dopa - 1-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa  
MAO: monoamina oxidase  
Nacc: núcleo accumbens  
NEO: teste de neofagia  
NF: teste do nado forçado  
PCR: reação em cadeia da polimerase  
PIP 2: fosfatidilinositol bifosfato  
PKA - Proteína kinase A  
RME: Ressonância Magnética Estrutural  
RNA: ácido ribonucleico  
TH: tirosina hidroxilase  
VMAT: transportador de monoamina vesicular  
VTA: área tegmental ventral

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....  | 14 |
| 1.1- SINALIZAÇÃO DOPAMINÉRGICA.....  | 14 |
| 1.2 – NEURODESENVOLVIMENTO E DOPAMINA.....   | 18 |
| 1.3- DOPAMINA E DISTÚRBIOS NEUROPSIQUIÁTRICOS ASSOCIADOS AO<br>DESENVOLVIMENTO .....   | 22 |
| 1.4- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....  | 24 |
| <b>2. EFEITOS DO AUMENTO DO TÔNUS DOPAMINÉRGICO NO PERÍODO PÓS-NATAL<br/>EM CAMUNDONGOS PRÉ-PÚBERES</b> .....  | 25 |
| 2.1 INTRODUÇÃO .....   | 25 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 27 |
| 2.3 MÉTODOS .....  | 28 |
| <b>2.3.1. Animais e procedimento experimental</b> .....  | 28 |
| <b>2.3.2. Testes comportamentais</b> .....   | 30 |
| 2.3.2.a. <i>Teste do labirinto em cruz elevado</i> .....   | 30 |
| 2.3.2.b. <i>Teste da caixa de atividades</i> .....   | 30 |
| 2.3.2.c. <i>Teste do nado forçado</i> .....  | 31 |
| 2.3.2.d. <i>Teste da neofagia</i> .....  | 31 |
| <b>2.3.3. Obtenção e análise de imagens por ressonância magnética estrutural</b> .....   | 32 |
| <b>2.3.4. Histologia: método de Golgi</b> .....  | 32 |
| <b>2.3.5. Análise estatística</b> .....  | 34 |
| 2.4 RESULTADOS.....  | 34 |
| <b>2.4.1. Camundongos fêmeas e machos pré-púberes que passaram por modificações da<br/>sinalização dopaminérgica durante o período pós-natal apresentam alterações<br/>comportamentais distintas</b> ..... | 34 |
| 2.4.1.a. <i>A ativação do receptor dopaminérgico D1 pós-natal altera o comportamento de análise<br/>de risco de animais pré-púberes no teste do labirinto em cruz elevado</i> .....                        | 34 |
| 2.4.1.b. <i>A administração de quinpirole no período pós-natal altera o comportamento<br/>exploratório apenas de camundongos pré-púberes machos no teste da caixa de atividade</i> .....                   | 36 |
| 2.4.1.c. <i>Administração de quinpirole e SKF 38393 no período pós-natal altera somente o<br/>comportamento de machos pré-púberes no teste do nado forçado</i> .....                                       | 38 |
| 2.4.1.d. <i>O aumento do tônus dopaminérgico pós-natal altera o comportamento de machos e<br/>fêmeas pré-púberes no teste da neofagia</i> .....  | 41 |
| <b>2.4.2. O aumento do tônus dopaminérgico no período pós-natal não causa alterações no<br/>volume total do hipocampo de camundongos pré-púberes</b> .....   | 43 |
| <b>2.4.3. Administração de SKF 38393 no período pós-natal reduz a arborização dendrítica<br/>apenas no hipocampo de fêmeas pré-púberes</b> .....   | 44 |
| 2.5 DISCUSSÃO.....   | 47 |
| <b>3. EFEITOS DO AUMENTO AGUDO DO TÔNUS DOPAMINÉRGICO NO<br/>COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS PRÉ-PÚBERES</b> .....  | 55 |
| 3.1 INTRODUÇÃO .....   | 55 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 56 |
| 3.3 MÉTODOS .....  | 57 |
| <b>3.3.1. Animais e procedimento experimental</b> .....  | 57 |

|   |    |
|---|----|
| <b>3.3.2. Testes comportamentais</b> .....  | 58 |
| 3.3.2.a. <i>Teste do labirinto em cruz elevado</i> .....  | 58 |
| 3.3.2.b. <i>Teste da caixa de atividades</i> .....  | 58 |
| 3.3.2.c. <i>Teste do nado forçado</i> .....   | 58 |
| <b>3.3.3. Análise estatística</b> .....   | 59 |
| 3.4 RESULTADOS.....   | 59 |
| <b>3.4.1. Testes comportamentais</b> .....  | 59 |
| 3.4.1.a. <i>Teste do labirinto em cruz elevado: o aumento do tônus dopaminérgico em camundongos pré-púberes altera o comportamento de análise de risco</i> .....                | 59 |
| 3.4.1.b. <i>Teste da caixa de atividades: o aumento agudo do tônus dopaminérgico aos 30 dias altera o comportamento locomotor e exploratório apenas das fêmeas</i> .....        | 61 |
| 3.4.1.c. <i>Teste do nado forçado: o aumento agudo do tônus dopaminérgico aos 30 dias altera o comportamento tipo depressivo de camundongos machos e fêmeas</i> .....           | 63 |
| 3.5 DISCUSSÃO.....  | 65 |
| <b>4. EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO DESAFIO DOPAMINÉRGICO EM CAMUNDONGOS PRÉ-PÚBERES PREVIAMENTE EXPOSTOS AO DISTÚRBIO NA SINALIZAÇÃO DOPAMINÉRGICA NO PERÍODO PÓS-NATAL</b> ..... | 70 |
| 4.1 INTRODUÇÃO .....  | 70 |
| 4.2 OBJETIVOS .....   | 71 |
| 4.3 MÉTODOS .....   | 72 |
| <b>4.3.1. Animais e procedimento experimental</b> .....   | 72 |
| <b>4.3.2. Testes comportamentais</b> .....  | 73 |
| 4.3.2.a. <i>Teste do labirinto em cruz elevado</i> .....  | 73 |
| 4.3.2.b. <i>Teste da caixa de atividades</i> .....  | 73 |
| 4.3.2.c. <i>Teste do nado forçado</i> .....   | 73 |
| <b>4.3.3. Análise estatística</b> .....   | 74 |
| 4.4 RESULTADOS.....   | 74 |
| <b>4.4.1. Testes comportamentais</b> .....  | 74 |
| 4.4.1.a. <i>Teste do labirinto em cruz elevado:</i> .....   | 74 |
| 4.4.1.b. <i>Teste da caixa de atividades:</i> .....   | 76 |
| 4.4.1.c. <i>Teste do nado forçado:</i> .....  | 78 |
| 4.5 DISCUSSÃO.....  | 80 |
| <b>5. CONCLUSÃO</b> .....   | 84 |
| <b>6. REFERÊNCIAS</b> .....   | 85 |

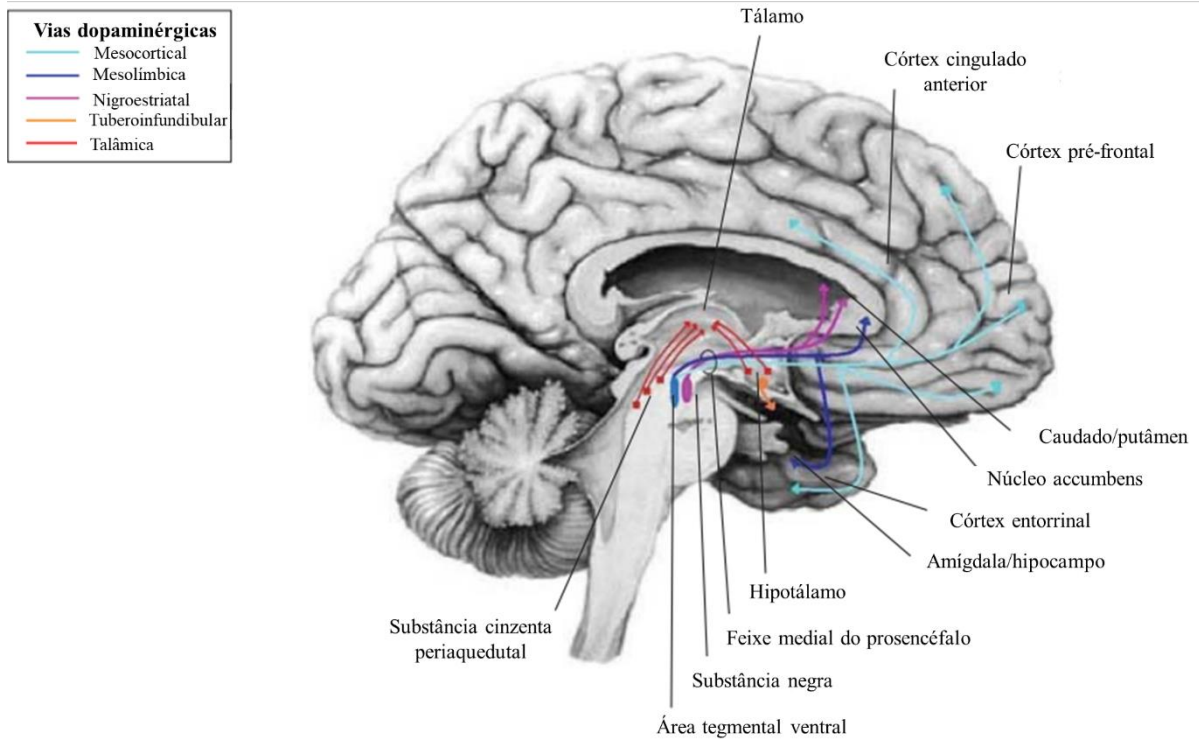
# 1. REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1- SINALIZAÇÃO DOPAMINÉRGICA

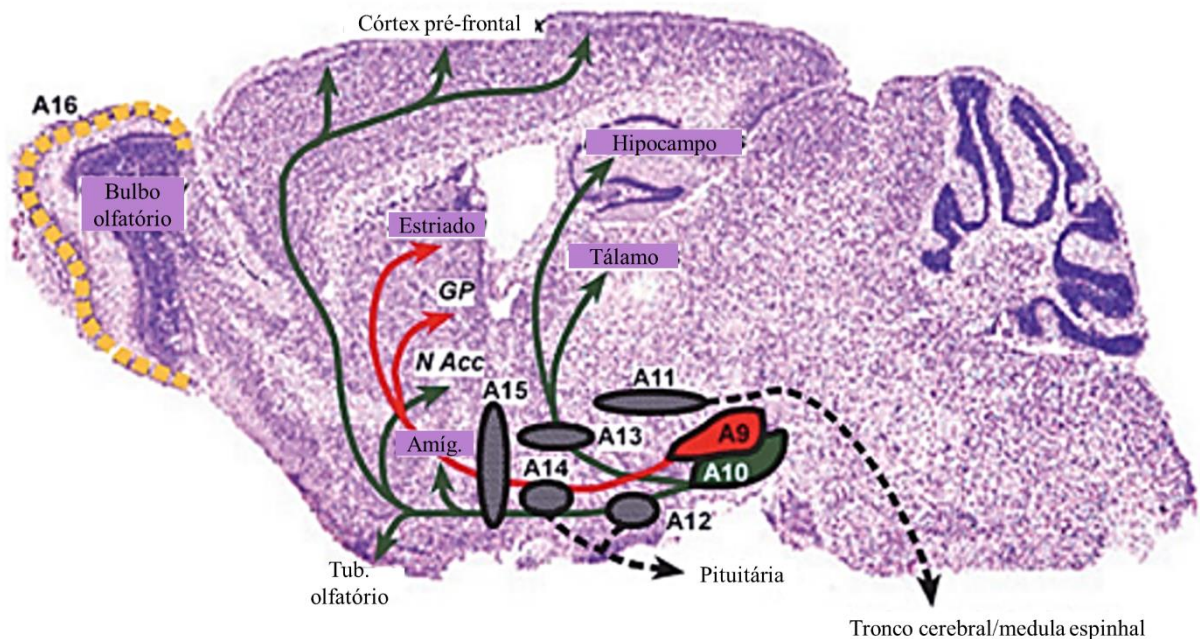
Desde a descoberta das funções fisiológicas da 3-hidroxitiramina (dopamina), há mais de 50 anos, este neurotransmissor catecolaminérgico tem atraído muita atenção. A dopamina (DA) é um metabólito do aminoácido tirosina e, no cérebro adulto, os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos estão concentrados na substância negra, área tegmental ventral e o campo retrorubral, os quais projetam para o gânglio basal, bulbo olfativo, região límbica, hipocampo e córtex. O córtex pré-frontal também é rico em DA, o que corrobora sua importância para funções como raciocínio, planejamento, resolução de problemas e desempenho de atividades coordenadas em humanos (DIAMOND *et al.*, 2004). É possível identificar cinco circuitos dopaminérgicos no cérebro de mamíferos (vide Figuras 1 e 2) (ARIAS-CARRIÓN *et al.*, 2010; BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011):

- Nigroestriatal – projeta-se da substância negra no mesencéfalo até o corpo estriado, sendo muito importante no controle da atividade motora somática.
- Mesocortical – origina-se na área tegmental ventral e segue até o córtex frontal, atuando na regulação de processos cognitivos.
- Tuberoinfundibular – projeta-se do hipotálamo para a glândula pituitária anterior, regulando a secreção de hormônios.
- Mesolímbica – origina-se na área tegmental ventral e se projeta para o corpo estriado ventral, sistema límbico e córtex pré-frontal. Admite-se que esta via seja importante na regulação do comportamento emocional.
- Talâmica - Trata-se de uma via que inerva o tálamo nos primatas e tem sua origem em diferentes lugares do cérebro. Suas funções ainda não estão totalmente esclarecidas.

DA é formada através de uma cascata enzimática. A enzima tirosina hidroxilase (TH) catalisa a conversão de tirosina em L-Dopa, que por sua vez é convertido em DA pela enzima l-aminoácido enzimático descarboxilase (dopa descarboxilase). As enzimas responsáveis pela degradação da DA são a monoamina oxidase (MAO) e a catecol-O-metil-transferase (COMT). O produto final de degradação da DA pela ação das duas enzimas MAO e COMT é o ácido homovanílico (HVA) (STANDAERT e GALANTER, 2009).

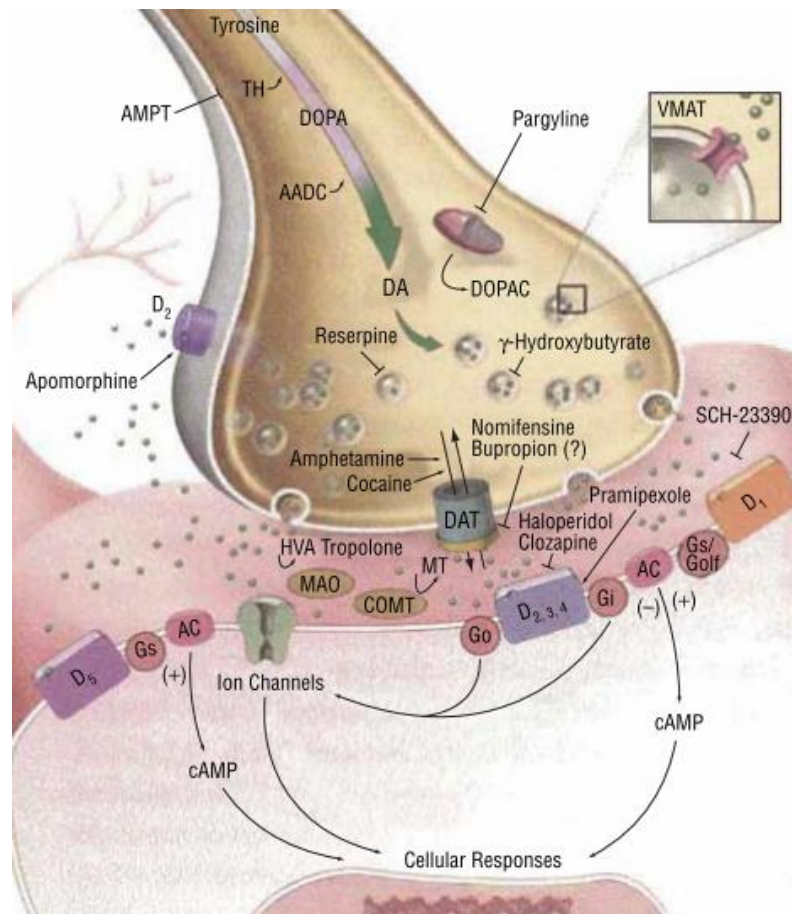


**Figura 1:** Circuitos dopaminérgicos no cérebro humano. Fonte: adaptado de DUNLOP; NEMEROFF, 2007.



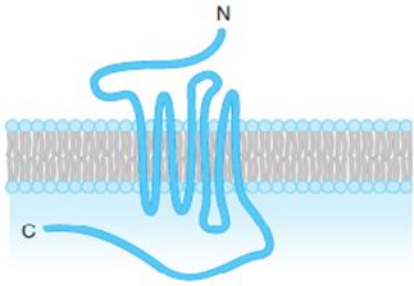
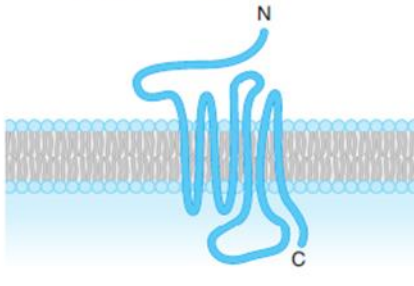
**Figura 2:** Posições e projeções axonais dos diferentes grupos de células dopaminérgicas em visão sagital do cérebro de roedores adultos. Os grupos A9 (SNc, vermelho) e A10 (VTA, verde) mesencefálicos projetam-se para o estriado dorsolateral e globo pálido (GP), ou para o estriado ventromedial (núcleo accumbens, NAcc), amígdala, tubérculo olfatório e córtex pré-frontal, respectivamente. A localização aproximada dos grupos diencefálicos A11-A15 do hipotálamo / tálamo ventral (campos cinza) e suas projeções descendentes no tronco cerebral / medula espinhal são indicadas por linhas tracejadas, pois não se colocam dentro da mesma seção. A inervação da hipófise anterior pelo sistema tuberoinfundibular é indicada por uma linha tracejada e seta. O grupo A16 telencefálico consiste em interneurônios periglomerulares dentro do bulbo olfatório (linha tracejada amarela). Fonte: adaptado de PRAKASH; WURST, 2006.

As ações fisiológicas da DA são mediadas por cinco receptores (D1 a D5) acoplados à proteína G, distintos, porém intimamente relacionados que são divididos em dois grandes grupos, D1 e D2 (CIVELLI, 1993; MISSALE et al., 1998; VALLONE; PICETTI; BORRELLI, 2000; LERICHE et al., 2008; RONDOU; HAEGEMAN; VAN CRAENENBROECK, 2010). A estimulação dos receptores tipo D1 (D1 e D5) resulta num aumento da formação de AMPc e fosforilação de DARPP-32, enquanto os receptores tipo D2 (D2, D3 e D4) mediam a diminuição da formação de AMPc e a fosforilação da Akt, conforme pode ser visto na Figura 3.



**Figura 3:** Sinalização sináptica dopaminérgica. AADC=descarboxilase de ácido aromático; AMPT=α-metilparatirosina; AC=adenilil ciclase; AMPc=monofosfato de adenosina cíclico; COMT=catecol-O-metiltransferase; D1-D5= receptores de DA 1 a 5; DAT=transportador de DA; DOPAC=ácido di-hidroxifenilacético; Gi, Go e Gs=subunidades proteicas; HVA=ácido homovanílico; MAO=monoamina oxidase; MT= 3-metoxitiramina; TH=tirosina hidroxilase; e VMAT=transportador de monoamina vesicular. Fonte: adaptado de DUNLOP; NEMEROFF, 2007.



|                                  | Família do Receptor D1  |                         | Família do Receptor D2   |   |   |
|----------------------------------|---|-------------------------|--|---|---|
| Estrutura esquemática            |    |                         |    |   |   |
| Sistemas de segundos mensageiros | <ul style="list-style-type: none"> <li>↑ cAMP (através de G<sub>s</sub>)</li> <li>↑ Hidrólise de PIP<sub>2</sub></li> <li>Mobilização do Ca<sup>2+</sup> (através do IP<sub>3</sub>)</li> <li>Ativação da PKC (através do DAG)</li> </ul> |                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>↓ cAMP (através de G<sub>i</sub>)</li> <li>↑ Correntes de K<sup>+</sup></li> <li>↓ Correntes de Ca<sup>2+</sup> reguladas por voltagem</li> </ul> |   |   |
| Distribuição no SNC              | <b>D1</b>   | <b>D5</b>               | <b>D2</b>  | <b>D3</b>   | <b>D4</b>                                       |
|                                  | Estriado<br>Neocórtex   | Hipocampo<br>Hipotálamo | Estriado<br>Substância negra<br>Hipófise   | Tubérculo olfatório<br><i>Nucleus accumbens</i><br>Hipotálamo | Córtex frontal<br>Medula oblonga<br>Mesencéfalo |

**Figura 4:** Estrutura e distribuição dos receptores dopaminérgicos no sistema nervoso central. Fonte: adaptado de STANDAERT e GALANTER, 2009.

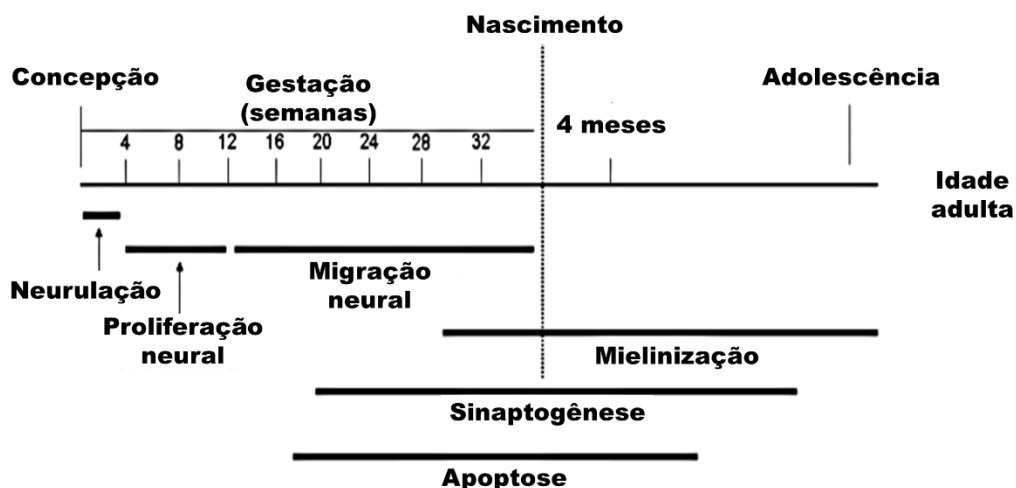
No cérebro de mamíferos adultos, receptores D1 são expressos com elevada densidade nas áreas nigrostriatal, mesolímbica e mesocortical, e em níveis mais baixos no hipocampo, cerebelo, áreas do tálamo e hipotálamo. Receptores D5 são expressos em níveis baixos em várias regiões do cérebro adulto, incluindo neurônios piramidais do córtex pré-frontal, córtex pré-motor, cíngulo, entorrinal, substância negra, hipotálamo, hipocampo e giro denteado. (LERICHE *et al.*, 2008). Os mais altos níveis de receptores D2 são encontrados no estriado, núcleo acumbens e tubérculo olfativo. Receptores D2 também são expressos em níveis significativos na substância negra, área tegmental ventral, hipotálamo, áreas corticais, septo, amígdala e hipocampo (SEEMAN, 2006). O receptor D3 tem um padrão mais restrito de distribuição, sendo a maior expressão observada nas áreas límbicas (MISSALE *et al.*, 1998). O receptor D4 tem o menor nível de expressão no cérebro, sendo reportado no córtex frontal, amígdala, hipocampo, hipotálamo, globo pálido, substância negra e tálamo (RONDOU; HAEGEMAN; VAN CRAENENBROECK, 2010) (Vide Figura 4).

Ratos que tiveram o gene de tirosina hidroxilase suprimido (KO) mostraram-se hipoativos e apresentaram adipsia e afagia, quadro revertido após tratamento com L-Dopa (ZHOU; PALMITER, 1995). Já foi demonstrado que diferenças genótípicas na COMT podem gerar alterações na distribuição pré-frontal da DA, levando a alterações no desempenho cognitivo específico em crianças (DIAMOND *et al.*, 2004). A presença de um polimorfismo no gene

COMT, envolvendo a substituição de um aminoácido Val por um Met na proteína, codifica diferentes formas da enzima. A forma gerada pelo alelo Val possui atividade três a cinco vezes mais alta do que a forma gerada pelo alelo Met. Conseqüentemente, o alelo Val está associado com o aumento do catabolismo, e a conseqüente menor disponibilidade de DA, o que parece estar relacionado com a diminuição da eficiência da atividade do córtex pré-frontal dorsolateral, o que pode contribuir para prejuízos nas funções cognitivas que ocorrem nesta região (PARK; WALDMAN, 2014).

## 1.2 – NEURODESENVOLVIMENTO E DOPAMINA

O sistema nervoso se origina do ectoderma, que sofre um espessamento formando a placa neural por volta do 20º dia de gestação (em humanos). A partir deste estágio, ocorre uma série de transformações morfológicas, processos de diferenciação e organização do tecido, didaticamente divididos em proliferação neuronal, migração, diferenciação, sinaptogênese e mielinização (MARSH; GERBER e PETERSON, 2008). As figuras 5 e 6 ilustram a linha do tempo dos principais eventos associados ao desenvolvimento cerebral em humanos e ratos.

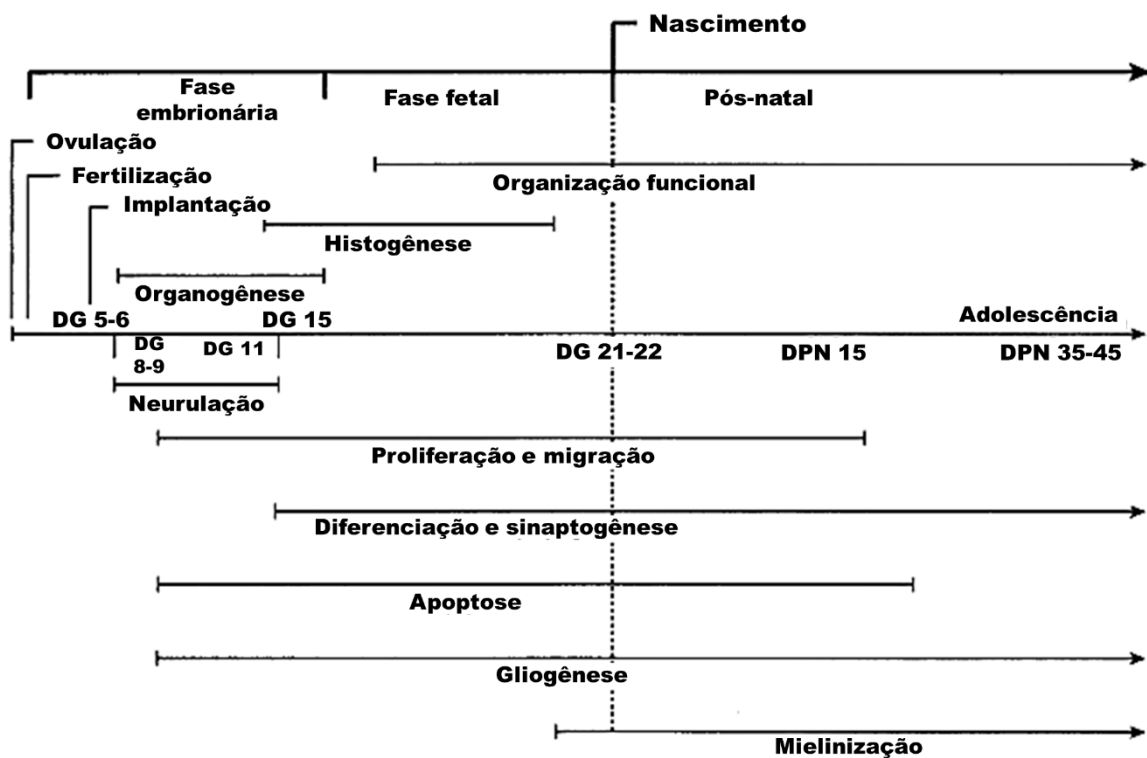


**Figura 5:** Principais eventos do desenvolvimento cerebral humano. Fonte: adaptado de MARSH; GERBER; PETERSON, 2008.

Embora os genes determinem o desenvolvimento básico do SNC, o desenvolvimento dos circuitos neuronais é dependente da ação dos neurotransmissores e neuromoduladores. Eles podem promover, ampliar, inibir ou atenuar o potencial de ação do neurônio subsequente. Desse modo, modulam os padrões de sinalização das redes neuronais e, conseqüentemente, fenômenos da plasticidade cerebral. As catecolaminas – entre as quais a DA - aparecem nos

embriões de vertebrados e invertebrados antes mesmo da diferenciação dos neurônios (PENDLETON *et al.*, 1998; HERLENIUS; LAGERCRANTZ, 2004).

A DA e seus receptores aparecem no cérebro em desenvolvimento no início do período embrionário, antes do início da sinaptogênese (ARAKI; SIMS; BHADE, 2007; DIAZ *et al.*, 1997; OHTANI *et al.*, 2003). O aparecimento de neurônios dopaminérgicos é observado em fases precoces do desenvolvimento, na idade gestacional de 10-15 dias em ratos e 6-8 semanas em humanos, sendo mais cedo nas mulheres do que em homens (LAGUNA; ISLANDS, 1992; SUNDSTRM *et al.*, 1993). Shearman; Zeitzer e Weaver (1997) demonstraram que os receptores dopaminérgicos D1 já estão ativos na fase final da gestação em ratos (dia gestacional 20 – GD20), o que sugere que a exposição da fêmea a drogas de abuso com ação por vias dopaminérgicas pode influenciar a função cerebral dos fetos.



**Figura 6:** Linha do tempo dos processos de desenvolvimento no sistema nervoso de ratos comparados ao momento da fertilização, organogênese e histogênese. DG = dia gestacional; DPN = dia pós-natal. Fonte: adaptado de RICE; JR, 2000.

Em 2011 novas pesquisas utilizando hibridização *in situ* e PCR mostraram que os receptores D1 e D2 tem diferentes trajetórias de desenvolvimento no córtex pré-frontal medial e estriado de ratos (SILLIVAN; KONRADI, 2011). Um dado interessante desta pesquisa é que as cascatas de sinalização dopaminérgicas de D1 e D2 já estão ativas nestas duas regiões no GD

15, embora as fibras dopaminérgicas ainda não alcancem o córtex pré-frontal medial e nem haja liberação de DA no córtex pré-frontal nesta idade. Esse achado demonstra que os receptores dopaminérgicos são farmacologicamente funcionais mesmo na ausência de inervação dopaminérgica. Como as duas regiões descritas são importantes para a cognição, atenção, movimento, emoção e aprendizagem, a conectividade aberrante dessas regiões poderia alterar padrões de comportamento mais tarde na vida, como ocorre em patologias como a esquizofrenia (ZALESKY *et al.*, 2011).

A sinalização dopaminérgica pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento dos gânglios da base. Schmidt *et al.*, (1996) demonstraram que a administração de DA em baixas concentrações, bem como do agonista do receptor D1 SKF 38393 no dia embrionário 17 (E17) aumentaram o número de cones de crescimento tanto quanto o comprimento e a arborização dos neuritos do estriado, sugerindo que a diferenciação de neurônios do estriado embrionário é promovida pela projeção dopaminérgica nigroestriatal através de receptores tipo D1 (SCHMIDT *et al.*, 1996).

Os receptores dopaminérgicos, em particular D3, são abundantemente expressos durante o desenvolvimento do cérebro nas zonas germinativas neuroepiteliais, que são ativamente envolvidas na neurogênese no prosencéfalo basal, apoiando assim a hipótese de que a DA desempenha um papel no desenvolvimento do cérebro durante a neurogênese (DIAZ *et al.*, 1997). Com efeito, a ativação de receptores do tipo D1 e D2 pode ativar ou inibir, respectivamente, a proliferação de células precursoras na eminência ganglionar lateral, que é a precursora neuroepitelial do estriado, e no neuroepitélio cortical, o precursor germinal do córtex pré-frontal dorsomedial no cérebro em desenvolvimento (OHTANI *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005).

A ativação de receptores dopaminérgicos influencia a formação do sistema GABAérgico no pallium do zebrafish, a migração de neurônios GABAérgicos do prosencéfalo basal para o córtex cerebral (SOUZA; TROPEPE, 2011; CRANDALL *et al.*, 2007) e a diferenciação de neurônios corticais e do estriado (STANWOOD; LEVITT, 2007). Níveis extremamente elevados de receptores D1 foram relatados no globo pálido durante o período perinatal (BOYSON; ADAMS, 1997). A estimulação do receptor D1 regula a transcrição de outros genes, e é possível que a estimulação anormal perinatal resulte em consequências em longo prazo.

Estudos têm demonstrado que os receptores tipo D2 (principal alvos dos medicamentos antipsicóticos) modulam a atividade da proteína Akt, que está alterada em esquizofrênicos. Esta

proteína atua na regulação de processos celulares diretamente relacionados ao desenvolvimento neurológico, incluindo a transcrição genética, a proliferação celular e a migração neuronal; o que permite inferir que alterações na sinalização dopaminérgica relacionadas à Akt durante o desenvolvimento do cérebro poderiam gerar danos na formação dos circuitos neurais (SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011).

Souza *et al.* (2011) avaliaram o impacto da alteração da sinalização dopaminérgica no desenvolvimento do cérebro e no comportamento motor de larvas de zebrafish (*Danio rerio*). Foi demonstrado que a ativação do receptor D2 suprime a atividade de Akt no cérebro destas larvas, e que esta redução D2 dependente regula negativamente o comportamento motor, de maneira oposta à regulação exercida pela via dependente de D1. Também foi demonstrado que a alteração na sinalização via D2 ou a inibição direta da atividade de Akt gera significativa redução quantitativa de neurônios gabaérgicos em diversas regiões do cérebro.

Uma implicação interessante do papel da DA na proliferação e diferenciação celular é a probabilidade de que mesmo um desequilíbrio transitório dos níveis de DA no desenvolvimento do cérebro poderia se traduzir em prejuízos duradouros na estrutura e função do cérebro maduro. Desequilíbrios de DA podem ocorrer após o contato materno com drogas como a cocaína, que atravessam a barreira placentária e interferem nos mecanismos dopaminérgicos de sinalização no cérebro fetal (JONES *et al.*, 2000; SHEARMAN, L.P. ; COLLINS, L.M. ; MEYER, 1996). Distúrbios neuro-funcionais, como a esquizofrenia, transtorno do espectro do autismo e transtorno do déficit de atenção e hiperatividade também parecem estar associados ao desequilíbrio dopaminérgico e de outros neurotransmissores no período de desenvolvimento do cérebro (CASANOVA, BUXHOEVEDEN, e GOMEZ, 2003; VOLKMAR, 2001).

Qualquer fonte de DA pré-natal, incluindo a fornecida pela mãe, poderia afetar o desenvolvimento do cérebro do feto. A expressão precoce, funcionalidade e a capacidade dos receptores de ativar as cascatas de sinalização conferem ao sistema dopaminérgico o poder de influenciar a progressão do desenvolvimento do cérebro e a conectividade da rede neural. Isso significa que anormalidades na função fetal dos receptores de DA poderiam, assim, alterar os padrões de conexão do cérebro, com consequências prejudiciais para a função cerebral e alguma fase da vida (BOUCHARD, 2004; BONNIN *et al.*, 2007).

### 1.3- DOPAMINA E DISTÚRBIOS NEUROPSIQUIÁTRICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO

A esquizofrenia afeta cerca de 0,5 a 1,0% da população mundial, sendo a sétima doença mais onerosa para a sociedade (ROSS *et al.*, 2006; MEYER; MACCABE, 2012). As manifestações iniciais ocorrem mais frequentemente na segunda ou terceira década da vida (FRANGO, 2008). Alterações sutis da cognição, interação social, função motora e morfologia têm sido observadas em indivíduos que posteriormente desenvolveram esquizofrenia, o que sustenta a hipótese de que a doença pode ser compreendida, pelo menos em parte, como uma desordem do desenvolvimento cerebral (CORNBLATT *et al.*, 2003; INSEL, 2010).

A hipótese da DA para esquizofrenia é baseada na ideia de que a neurotransmissão de DA é aumentada nesta patologia. Van Rossum (1967 apud SEEMAN, 2013) formulou a hipótese original. Ele afirmou que estimulação excessiva dos receptores de DA poderia ser parte da etiologia, e que esta sobre-estimulação poderia ser causada por produção excessiva de DA, produção de substâncias com ações similares à DA, susceptibilidade anormal dos receptores, dentre outros fatores. Além disto, uma propriedade farmacológica compartilhada por muitos antipsicóticos atualmente disponíveis é a capacidade de bloquear o receptor dopaminérgico D2 (KAPUR; REMINGTON, 2001).

Enquanto a liberação de DA endógena nos terminais pré-sinápticos estimulada por anfetamina é aumentada em esquizofrênicos, a densidade de receptores D2 pré-sinápticos (auto receptores de DA) é normal (LYON *et al.*, 2011; FUSAR-POLI; MEYER-LINDENBERG, 2013a), mas há um aumento de 14% da capacidade de síntese de DA (FUSAR-POLI; MEYER-LINDENBERG, 2013b; SEEMAN, 2013). O receptor D2 pós-sináptico continua a ser o principal alvo terapêutico para a ação antipsicótica, seja por antagonistas ou agonistas parciais, como o aripiprazol. Além do papel farmacológico do receptor D2 como alvo antipsicótico, há achados que indicam que vários aspectos de D2 contribuem para a psicose em geral, ou esquizofrenia, em particular (SEEMAN; KAPUR, 2000; SEEMAN, 2006).

A teoria dopaminérgica foi reformulada mais tarde como um desequilíbrio entre o excesso de DA subcortical e um déficit de DA cortical, à luz de evidências sugerindo déficit cortical pré-frontal em esquizofrênicos e o papel da DA na mediação de processos cognitivos pré-frontais (WEINSTEIN *et al.*, 2017). Baseado no desequilíbrio dopaminérgico no cérebro de esquizofrênicos, nas alterações morfológicas encontradas nos cérebros destes pacientes, e no papel da sinalização dopaminérgica durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, fica

evidente a necessidade de estudos que conectem estes temas para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na etiologia da doença – conhecimento necessário para a proposição de novas abordagens terapêuticas.

O transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é uma desordem do neurodesenvolvimento, comumente reconhecida durante a infância, sendo caracterizado por desatenção excessiva e/ou hiperatividade e impulsividade, bem como disfunção executiva, falta de autocontrole emocional e motivação. Pesquisas clínicas mostraram que as características predominantes do TDAH em adultos diferem daquelas vistas em crianças, com adultos apresentando sintomas menos evidentes de hiperatividade ou impulsividade e mais sintomas de desatenção (SUBCOMMITTEE ON ATTENTION-DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER, 2012; DAVIES, 2014; FARAONE *et al.*, 2015; BADGAIYAN *et al.*, 2015; BONVICINI; FARAONE; SCASSELLATI, 2016).

Estudos já demonstraram que, em relação aos controles, crianças com TDAH apresentam anormalidades difusas e regionais da substância cinzenta. Consistente com sua função na inibição da resposta, o córtex da pars opercularis (giro frontal inferior) é mais fino em crianças com TDAH que, como esperado, apresentaram desempenho inibitório significativamente pior em uma tarefa Go / No-go. Estas diferenças mantêm-se para ambos os hemisférios, levantando a possibilidade de que uma anormalidade no desenvolvimento do giro frontal inferior possa levar ao desenvolvimento da dificuldade de inibição (BATTY *et al.*, 2010).

O TDAH é um transtorno complexo e heterogêneo, e sua etiologia ainda não está completamente elucidada. Apesar das evidências de que fatores ambientais têm um papel importante, estudos também sustentam uma forte contribuição genética, com estimativas de herdabilidade que chegam a 75% em crianças. O fator genético compreende um risco poligênico com variantes comuns e raras envolvidas (GRAHAM; SETH e COGHILL, 2007; LANGE *et al.*, 2012) e quatro loci gênicos relacionados à DA foram implicados: DAT1, DRD4, DBH e DRD5 (KIRLEY *et al.*, 2002).

A hipótese dopaminérgica no TDAH parte dos seguintes princípios (WU *et al.*, 2012):

- o papel crítico do sistema dopaminérgico nos processos motores, motivacionais e de recompensa, que são anormais em pacientes com TDAH;
- a aplicação de fármacos que atuam sobre receptores de DA melhora alguns dos sintomas de TDAH, como o metilfenidato, um bloqueador da recaptção de DA

#### 1.4- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As vias de sinalização dopaminérgicas modulam um amplo leque de funções vitais do sistema nervoso, entre as quais estão o comportamento motor, a memória, atenção, aprendizado, aspectos afetivos e de recompensa. Estudos têm, cada vez mais, constatado o envolvimento da sinalização dopaminérgica na etiologia de diversos transtornos neuropsiquiátricos, bem como sua importância para o desenvolvimento morfofisiológico do cérebro. Já foi demonstrado que a DA tem papel fundamental na formação, amadurecimento e funcionalidade fisiológica do sistema nervoso central, e que há janelas desenvolvimentais nas quais um desbalanço deste neurotransmissor pode levar à alterações em cadeia, que culminam com a manifestação de patologias com alto grau de disfuncionalidade.

Patologias como a esquizofrenia, depressão e o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade estão associados tanto com alterações na sinalização dopaminérgica quanto da morfologia do cérebro. São patologias que refletem alterações desenvolvimentais que levaram à formação de circuitos disfuncionais. Mas, em que ponto exato do desenvolvimento estas alterações começaram? Qual fator determina o grau de comprometimento e por que algumas janelas temporais são tão críticas para a susceptibilidade a danos permanentes?

Diante destas e outras questões, a proposta deste trabalho foi analisar os reflexos do aumento do tônus dopaminérgico durante o período perinatal (cinco primeiros dias de vida), em que ocorre intensa sinaptogênese. A hipótese testada é de que sobrecarga de DA nos cinco primeiros dias de vida, quando os circuitos neurais ainda estão em formação, causará alterações moleculares que serão refletidas no comportamento do animal aos 30 dias.

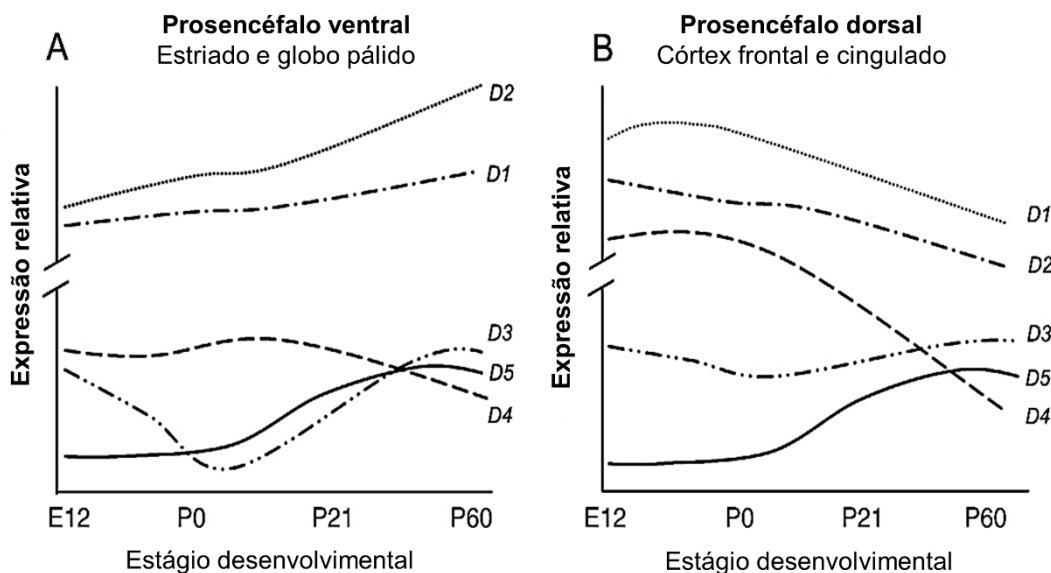
O objetivo geral da pesquisa foi avaliar os efeitos do distúrbio da sinalização dopaminérgica no neurodesenvolvimento pós-natal em camundongos jovens machos e fêmeas a nível comportamental e morfológico. Para alcançar este objetivo foram propostos três delineamentos experimentais abordando janelas desenvolvimentais específicas, que serão apresentados e discutidos nos próximos três capítulos.



## 2. EFEITOS DO AUMENTO DO TÔNUS DOPAMINÉRGICO NO PERÍODO PÓS-NATAL EM CAMUNDONGOS PRÉ-PÚBERES

### 2.1 INTRODUÇÃO

Com relação à sinalização dopaminérgica, ao nascimento a expressão de RNA mensageiro para receptores de DA D1 e D2 no estriado de camundongos se aproxima da observada em adultos. Em contraste, a expressão dos receptores é baixa, e aumenta progressivamente até atingir níveis vistos em adultos entre os dias 14 e 21, sugerindo diferenças na regulação traducional dos receptores de DA em diferentes estágios de desenvolvimento (vide Figura 7) (GELBARD *et al.*, 1989; SCHAMBRA *et al.*, 1994; JUNG; JR, 1996; ARAKI; SIMS; BHITE, 2007). A migração dos neurônios dopaminérgicos para suas posições finais no mesencéfalo ventral e inervação de seus campos-alvo ocorre a partir de E12 e segue nas primeiras semanas pós-natais. Em ratos, essa "maturação" parece estar terminada em torno da terceira semana pós-natal, momento em que essa via adquire sua morfologia e funcionalidade totais (PRAKASH; WURST, 2006).



**Figura 7:** Resumo das diferenças entre o prosencéfalo ventral (A) e dorsal (B) em relação à expressão de mRNA dos receptores de DA em camundongos. O corpo estriado e o globo pálido foram agrupados no prosencéfalo ventral. O córtex frontal e cingulado no prosencéfalo dorsal. Os dados sobre a expressão pré-natal foram obtidos apenas do estriado (E12 e E15) e do córtex frontal (E15). E12 = dia embrionário 12; P = dia pós-natal. Fonte: adaptado de ARAKI; SIMS; BHITE, 2007.

Cerca de 48 horas após o nascimento muitas fibras dopaminérgicas podem ser observadas na zona marginal (futura camada I) do córtex pré-frontal de ratos. Mudanças na morfologia das

destas fibras em P4 sugerem que a inervação dopaminérgica está funcional nessa idade. No dia 6 pós-natal, as diferentes subáreas do córtex pré-frontal já podem ser reconhecidas de acordo com as características da distribuição topográfica das fibras dopaminérgicas (KALSBECK *et al.*, 1988).

Alterações na sinalização dopaminérgica no período perinatal, ainda que transitórias, são capazes de gerar modificações permanentes no desenvolvimento (LEVITT *et al.*, 1997). Matos *et al.* (2018) demonstraram que o aumento do tônus dopaminérgico com L-Dopa nos cinco primeiros dias pós-natais altera o comportamento motor, do tipo ansioso e anedônico de camundongos pré-púberes (DE MATOS *et al.*, 2018). Além disso, este período é marcado pela produção de hormônios sexuais, que modulam o desenvolvimento do cérebro de maneira sexualmente dimórfica (WRIGHT *et al.*, 2010). Machos apresentam maiores níveis de testosterona e estradiol que as fêmeas no período perinatal, o que leva a um relativo atraso do desenvolvimento do sistema dopaminérgico. Os altos níveis de estradiol induzem apoptose de neurônios dopaminérgicos e GABAérgicos no núcleo antero-ventral periventricular no hipotálamo de maneira mais acentuada nos machos (OVTCHAROFF *et al.*, 1992).

A maioria das drogas de abuso atravessa facilmente a placenta e pode afetar o desenvolvimento cerebral do feto (GANAPATHY, 2011). A exposição *in utero* às drogas, portanto, pode ter implicações duradouras para a estrutura e função do cérebro. Esses efeitos no sistema nervoso em desenvolvimento, antes que os mecanismos regulatórios homeostáticos sejam adequadamente calibrados, frequentemente diferem de seus efeitos no sistema maduro. Estudos com modelos experimentais têm demonstrado que a exposição à substâncias que alteram a sinalização dopaminérgica, como metanfetaminas, no período perinatal, leva a alterações cognitivas permanentes e manifestações neuropsiquiátricas patológicas mais tardiamente (ROBBINS; MILLS, 1993; RUBIO *et al.*, 1995; BOYSON; ADAMS, 1997; WOLANSKY *et al.*, 2004; CAMPOLONGO *et al.*, 2011; BEHNKE; SMITH, 2013; ROSS *et al.*, 2015).

Em camundongos os primeiros dias de vida são equivalentes, em termos de neurodesenvolvimento, ao terceiro trimestre de gestação em humanos (ROSS *et al.*, 2015). É um período de intensa sinaptogênese e apoptose, eventos necessários para a adaptação do animal ao novo ambiente (BLASCHKE; WEINER; CHUN, 1998). O uso do modelo animal neste período já permite a eliminação da metabolização das substâncias pela mãe, e o isolamento do fator de proteção da placenta, o que facilita a definição da dose a ser testada e permite melhor caracterização dos efeitos. Além disso, essa janela de desenvolvimento carece

de pesquisas que auxiliem na compreensão da etiologia de patologias neuropsiquiátricas desenvolvimentais, bem como de dados que possam tornar mais seguras as abordagens farmacológicas que, por vezes, são inevitáveis na primeira infância.

Com base em todas estas informações, foi proposto um delineamento experimental para avaliação dos efeitos do aumento do tônus dopaminérgico nos cinco primeiros dias de vida de camundongos a partir da administração de L-Dopa+benserazida (agonista dopaminérgico), quinpirole (agonista específico do receptor dopaminérgico D2) e SKF 38393 (agonista específico do receptor dopaminérgico D1).

Como janela temporal para a avaliação dos efeitos da aplicação do protocolo foi escolhida a idade de 4 semanas, que corresponde à pré-puberdade em camundongos. A adolescência é uma importante janela de desenvolvimento do sistema nervoso central (KNOLL *et al.*, 2016), incluindo as vias dopaminérgicas (TEICHER; ANDERSEN; HOSTETTER, 1995; WAHLSTROM; WHITE; LUCIANA, 2010), em função da variação hormonal pela qual o organismo passa (SCHULZ; MOLENDAS-FIGUEIRA; SISK, 2009). É também um período de vulnerabilidade a intervenções e fatores ambientais, que podem levar a manifestação de patologias como a esquizofrenia, depressão e ansiedade (BAMBICO *et al.*, 2010; GOMES; RINCÓN-CORTÉS; GRACE, 2016; GOBBI *et al.*, 2019). Trata-se de uma idade com riqueza e complexidade de eventos, e igualmente carente de pesquisas que colaborem para sua compreensão e o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas preventivas.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este delineamento experimental tem com objetivos específicos:

- Verificar os efeitos da administração de L-Dopa e dos agonistas dopaminérgicos quinpirole e SKF 38393 nos 5 primeiros dias pós-natais na atividade locomotora de camundongos jovens (1 mês), utilizando o teste da caixa de atividades.
- Verificar os efeitos da administração de L-Dopa e dos agonistas dopaminérgicos quinpirole e SKF 38393 nos 5 primeiros dias pós-natais no comportamento tipo ansioso de camundongos jovens (1 mês), utilizando o teste do labirinto em cruz elevado.
- Verificar os efeitos da administração de L-Dopa e dos agonistas dopaminérgicos quinpirole e SKF 38393 nos 5 primeiros dias pós-natais no comportamento tipo depressivo de camundongos jovens (1 mês), utilizando o teste do nado forçado.

- Verificar os efeitos da administração de L-Dopa e dos agonistas dopaminérgicos quinpirole e SKF 38393 nos 5 primeiros dias pós-natais no comportamento hedônico de camundongos jovens (1 mês), utilizando o teste da neofagia.
- Avaliar se a administração de L-Dopa, quinpirole e SKF 38393 nos 5 primeiros dias de vida é capaz de alterar a ramificação neural e/ou o perfil de espinhas dendríticas de neurônios do hipocampo de camundongos jovens (1 mês), por meio do método de Golgi-Cox.
- Analisar possíveis alterações morfométricas nos camundongos jovens (1 mês) que receberam a administração de L-Dopa, quinpirole e SKF 38393 nos primeiros 5 dias pós-natais, através da avaliação do volume do cérebro e do hipocampo destes animais por ressonância magnética nuclear.

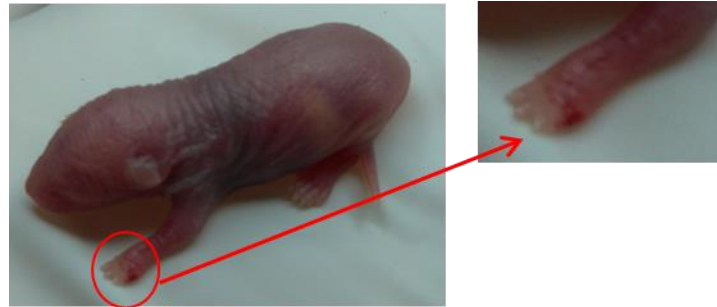
## 2.3 MÉTODOS

### 2.3.1. Animais e procedimento experimental

Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas primíparas, com idades de 8 a 12 semanas fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Protocolo CEUA n° 39/2015). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com maravalha em ambiente climatizado ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade 40-70%), com água e ração *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, sendo os machos alocados separadamente das fêmeas. No período de cruzamento machos e fêmeas eram alocados na mesma caixa, na proporção 1:2 por 5 dias. Para os experimentos as ninhadas tiveram seu tamanho padronizado em 9 filhotes, visando controlar os efeitos da variação do cuidado materno.

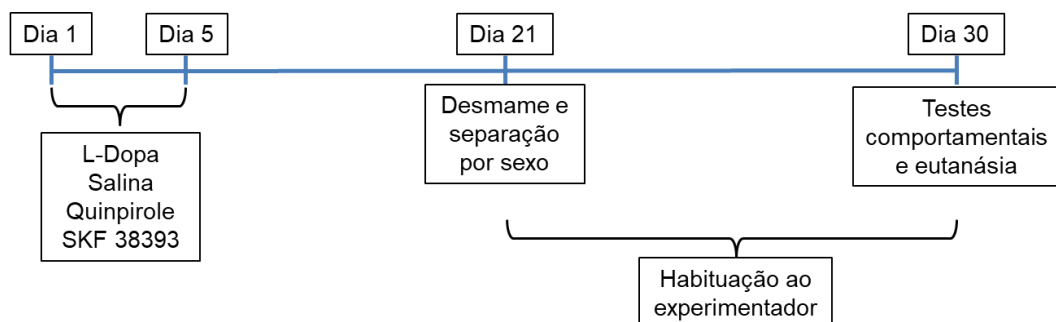
Após o nascimento os filhotes eram pesados e designados aleatoriamente para os grupos “controle” ou “tratado”. A marcação dos neonatos consistia no corte da falange distal do dedo mais externo das patas dianteiras, como mostra a Figura 8. Durante os cinco primeiros dias de vida os filhotes eram pesados e recebiam por via intraperitoneal L-Dopa + benserazida (Sigma Aldrich D1507 e B7283 respectivamente) nas doses de 10/5 ou 50/25 mg/kg, quinpirole (Sigma Aldrich Q111) 0,5mg/kg ou SKF-38393 (Sigma Aldrich D047) 5mg/kg, todos em volume de 10  $\mu\text{L}$  a cada 1,5g de peso do animal. O grupo controle recebia salina na mesma proporção volume/peso. As dosagens foram adaptadas a partir de estudos prévios do grupo (DE MATOS *et al.*, 2018) e dados da literatura (WACHTEL; BROODERSON; WHITE, 1992; GAO;

CUTLER, 1993), e incluímos a benserazida (inibidor da Dopa descarboxilase de ação periférica) para proteger o L-Dopa da metabolização antes de atingir o sistema nervoso central, já que a administração foi feita por via intraperitoneal (FLEMING *et al.*, 2006; ALLEN *et al.*, 2011; XIE *et al.*, 2014; LI; SAGOT; ZHOU, 2016).



**Figura 8:** Marcação de neonatos

Aos 21 dias os animais eram desmamados e separados por sexo, passando a ter contato com o experimentador por alguns minutos em dias alternados, até a execução dos testes comportamentais. O contato consistia no manuseio do animal em sua própria caixa, de modo semelhante ao que ocorreria durante a execução dos testes comportamentais, e visava a habituação do animal ao experimentador. Ao completarem 4 semanas (28 a 32 dias de vida) os animais eram submetidos aos testes comportamentais e eutanasiados, sendo os cérebros processados e guardados para análises posteriores. No dia dos testes comportamentais os animais eram pesados e habituados à sala de comportamento por cerca de uma hora antes dos experimentos. Um resumo do desenho experimental pode ser visto na Figura 9.



**Figura 9:** Esquema do procedimento experimental

## 2.3.2. Testes comportamentais

### 2.3.2.a. Teste do labirinto em cruz elevado

Trata-se de um teste de ansiedade baseado em respostas naturais dos animais. Foi inicialmente proposto por Pellow *et al.* (1985) para ratos e validado por Lister (1987) para camundongos. O equipamento consiste em dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 15 cm), também opostos, elevados a 45 cm do nível do solo. Os braços abertos apresentam uma barra lateral de 0,25 cm como proteção, para evitar a queda dos animais.

Os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços abertos, e tiveram seu comportamento filmado durante 5 minutos. Após cada teste o aparato foi higienizado com álcool 70% e seco. A análise dos vídeos foi realizada com auxílio do programa X-Plo-Rat (TEJADA; CHAIM; MORATO, 2017). Como parâmetros clássicos foram contabilizados a porcentagem de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, considerados apenas quando o animal colocava as quatro patas em um novo local. Assume-se que os braços abertos do labirinto combinam dois componentes naturalmente aversivos aos animais: o fato de ser ambiente novo e um espaço aberto. Em contrapartida, os braços fechados oferecem ao animal um ambiente protegido contra estímulos potencialmente nocivos, tais como a presença de predadores (WALF; FRYE, 2007).

Também foram contabilizados como parâmetros de ansiedade os comportamentos de “head dipping” (movimento descendente da cabeça dos roedores em direção ao chão a partir dos braços abertos), “rearings (quando o animal se apoia nas duas patas traseiras) e “stretchings” (quando o animal estica o corpo para frente sem mover as patas) (WALF; FRYE, 2007; BAILEY; CRAWLEY, 2009).

### 2.3.2.b. Teste da caixa de atividades

Esse teste foi inicialmente proposto por Hall (1934), relacionando a defecação e a atividade motora do animal no campo aberto como indicadores de seu estado emocional. Segundo o autor, alta defecação e baixa atividade locomotora indicariam um estado de ansiedade no animal. Também é possível utilizar o tempo de permanência do animal no centro do campo aberto como parâmetro mais seletivo de ansiedade, enquanto a movimentação na

periferia do aparato seria um indicador da atividade locomotora do animal, devido ao comportamento de tigmotaxia típico dos roedores (PRUT; BELZUNG, 2003).

O aparato consiste em uma caixa com dimensões 30 x 30 cm, confeccionada em acrílico com paredes transparentes de cerca de 30 cm e chão preto, que é acoplada a um sistema externo de infravermelho. No início do teste os animais foram colocados individualmente no centro da arena e tiveram a atividade locomotora e exploratória mensurada durante 20 minutos. O aparato foi limpo a cada novo teste com álcool 70%. Foi utilizado o sistema automatizado Actitrack v2.7.13 para avaliar a distância total percorrida horizontalmente pelo animal, o tempo de exploração nas divisões feitas na arena (centro e periferia) e sua exploração vertical (rearings).

#### 2.3.2.c. *Teste do nado forçado*

Este ensaio proposto por Porsolt, Bertin e Jalfre em 1977 é amplamente utilizado para mensurar comportamentos tipo depressivos em roedores, bem como para *screening* de novos agentes farmacológicos (PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005).

Os animais foram colocados, individualmente em béqueres de vidro contendo água ( $26^{\circ}\text{C}\pm 1$ ) até uma altura de cerca de 15 cm e tiveram o comportamento filmado por um período de 6 minutos. Foram contabilizados a latência para o primeiro episódio de imobilidade (quando o animal se movimenta o mínimo possível, apenas para se manter na superfície), o tempo total de imobilidade, o tempo total em que o animal tentou escalar as paredes e o tempo de nado, assim como a frequência destes comportamentos. Assume-se que a redução da latência para imobilidade, o aumento do tempo total de imobilidade e a redução dos comportamentos de escalada e nado denotam comportamento tipo depressivo dos animais. Todas as medidas foram realizadas a partir do momento em que o animal foi colocado na água.

#### 2.3.2.d. *Teste da neofagia*

Trata-se de um teste que mede a latência de um animal para consumir alimentos colocados no centro de uma arena desconhecida e bem iluminada, portanto aversiva, como parâmetros para caracterização de comportamento tipo ansioso. Em função da idade e peso dos animais o protocolo sofreu algumas adaptações a partir daquele descrito por Iijima *et al* (2012). Como os animais são pré-púberes e têm peso entre 20-25 gramas, o tempo de privação de alimento foi reduzido para que a perda de peso não fosse grande o bastante para comprometer

as análises. Os camundongos foram pesados antes do início do jejum e imediatamente antes do teste (IIJIMA; FUKUMOTO; CHAKI, 2012).

Os animais foram submetidos a jejum de 18 horas antes do teste, sendo a água mantida *ad libitum*. Para o teste foram utilizadas caixas medindo 50 x 50 cm com paredes brancas e cobertas com maravalha (1cm). No centro foi colocado um círculo de papel branco (10 cm de diâmetro) e sobre ele uma quantidade mensurada de ração padrão. Cada animal foi disposto na lateral da caixa e foram avaliados o tempo de latência para iniciar a alimentação e a quantidade ingerida pelos próximos 10 minutos. O teste foi realizado em 550 lux no centro do aparato.

### **2.3.3. Obtenção e análise de imagens por ressonância magnética estrutural**

O objetivo desta análise foi verificar possíveis alterações morfométricas no hipocampo dos camundongos que receberam a administração de agonistas dopaminérgicos no período pós-natal. As imagens foram obtidas após os experimentos comportamentais, quando os animais tinham 4 semanas de vida (28 a 32 dias).

Os animais foram inicialmente anestesiados com isoflurano (indução a 3% e manutenção a 1.0%) e oxigênio (2.0%), liberados em máscara facial acoplada ao focinho do animal, que tinha a cabeça fixada a um suporte para evitar artefatos de movimento durante as análises. As imagens foram obtidas utilizando-se um magneto de 4.7T NMR (Oxford Systems) controlado por console de imagens UNITY Inova-200 (Varian). O protocolo consistiu em imagens de múltiplas varreduras coronais (TR=300ms, TE=50ms), 20 a 23 contínuas, 1mm de espessura. As análises das imagens obtidas foram realizadas com o programa Image J, sendo a área do hipocampo normalizada pela área total do cérebro em cada fatia.

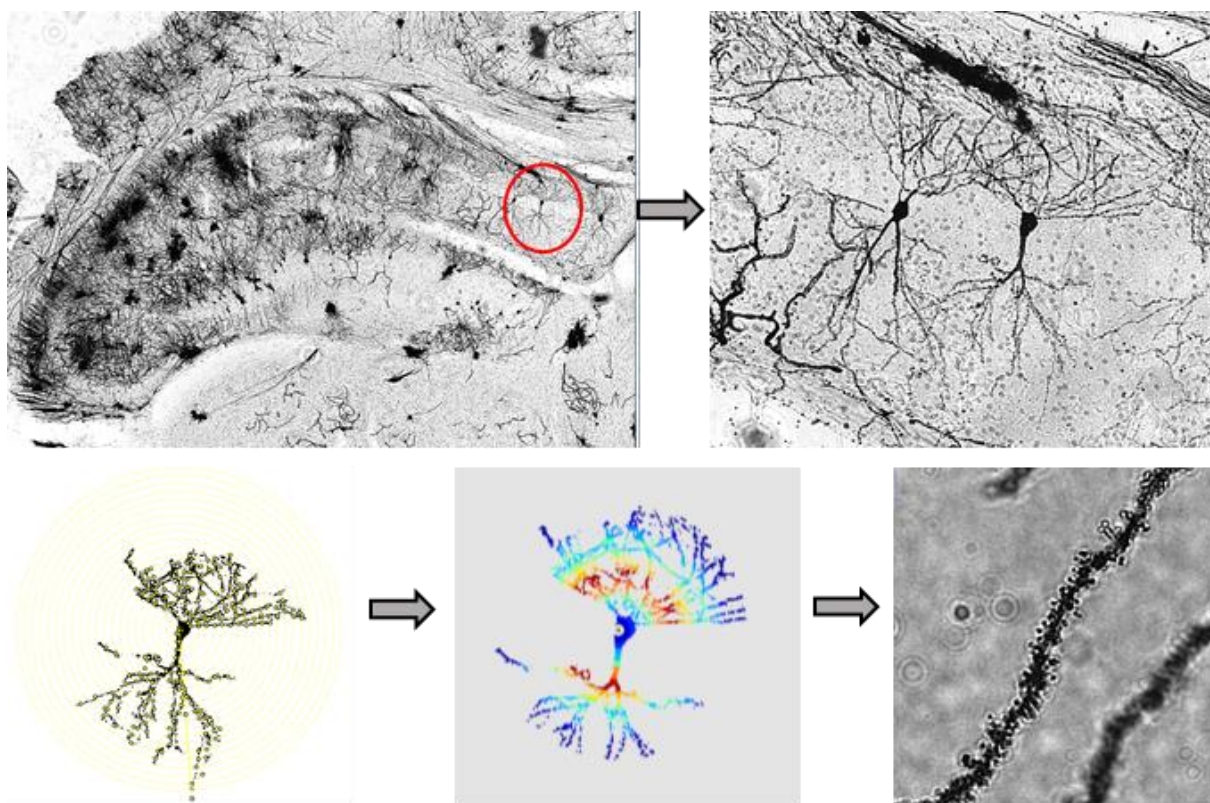
### **2.3.4. Histologia: método de Golgi**

Idealizado por Camillo Golgi (1873), o método de coloração de Golgi ainda é largamente utilizado e facilita a análise da morfologia neuronal com arborização axonal e dendrítica e espinhas através da visualização de uma baixa porcentagem de neurônios (1 –3%). Há três principais subtipos de coloração de Golgi: Golgi Rápido, Golgi-Kopsch e Golgi-Cox. (ZAQOUT; KAINDL, 2016). Em comparação com o método de Golgi, as vantagens do método de Golgi-Cox incluem a probabilidade de corar mais neurônios e também o fato de ser mais



consistente do que o método rápido de Golgi para estudar morfologia dendrítica (RANJAN; MALLICK, 2010).

Neste trabalho esta técnica foi utilizada para analisar o perfil de ramificação neural e espinhas dendríticas nos animais com 4 semanas, tratados com L-Dopa, quinpirole ou SKF 38393 no período pós-natal, bem como o grupo controle.



**Figura 10:** Coletânea de imagens do processo de análise do método de Golgi-Cox.

Após a eutanásia dos animais os cérebros foram removidos, lavados com água destilada e colocados em solução de Golgi-Cox (cloreto de mercúrio 5%, cromato de potássio 5% e dicromato de potássio 5%) por 14 dias, quando foram então submersos em solução de sacarose 30% por 5 a 8 dias. Após este período os cérebros foram fatiados em criostato (100 $\mu$ m a -17°C) e as fatias colocadas em lâminas de vidro gelatinizadas, lavadas e tratadas sequencialmente com soluções de hidróxido de amônio, tiosulfato de sódio, álcool 50%, 75%, 90% e 100% e xilol (ZAQOUT e KAINDL, 2016). Após secagem as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (aumento 20X) segundo protocolo baseado no trabalho de Orlowski e Bjarkam (2012), com auxílio do software ImageJ. Após ajuste da escala segundo especificações do microscópio, as imagens foram convertidas em binárias, sendo os neurônios isolados e analisados quanto ao

perfil de ramificações com a ferramenta sholl. Foram contabilizadas as interseções sobre círculos concêntricos com raios crescentes na medida de 10µm (Vide Figura 10).

### **2.3.5. Análise estatística**

As análises estatísticas dos dados obtidos, bem como a confecção dos gráficos foram realizadas com auxílio dos softwares SigmaPlot 11.0 e GraphPad Prism 6. Para os testes comportamentais, análise morfométrica do hipocampo e avaliação de espinhas dendríticas (Golgi-Cox) foram utilizadas One Way ANOVA para os dados paramétricos e One Way ANOVA On Ranks para os dados não paramétricos, seguidas dos testes de Tukey ou Dunn. Para análise da ramificação neural (Golgi-Cox) foi utilizada Two Way ANOVA. Foi adotado nível de significância de  $p < 0,05$ .

Os gráficos em boxplot apresentam a média/mediana e os valores mínimo e máximo. O número amostral de cada grupo é demonstrado na parte inferior dos gráficos. Diferenças significativas são representadas pelos símbolos \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) ou \*\*\* ( $p < 0,001$ ). A linha pontilhada representa a média do grupo naive, mas os dados deste grupo não foram incluídos nas análises estatísticas.

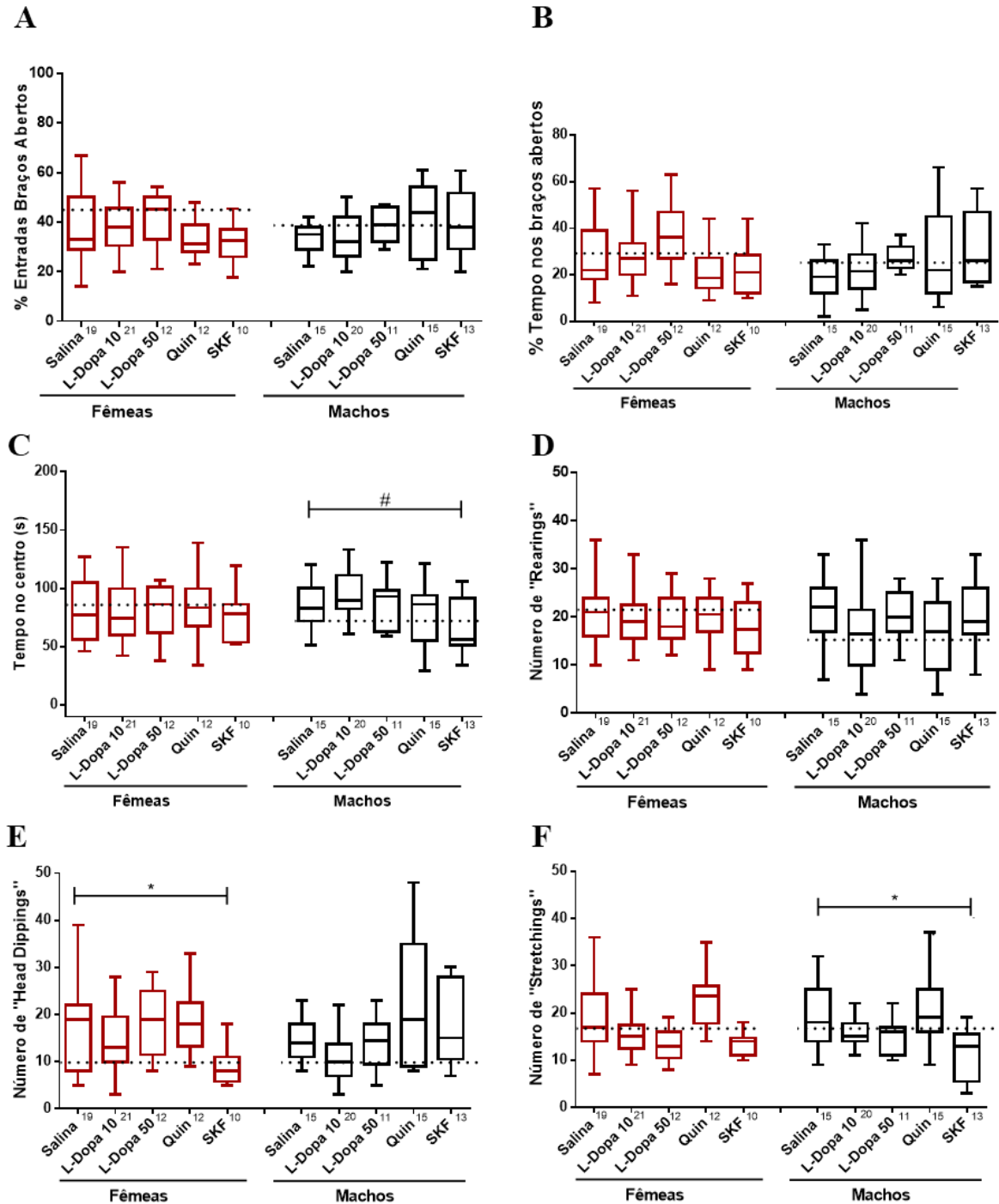
## **2.4 RESULTADOS**

### **2.4.1. Camundongos fêmeas e machos pré-púberes que passaram por modificações da sinalização dopaminérgica durante o período pós-natal apresentam alterações comportamentais distintas**

#### *2.4.1.a. A ativação do receptor dopaminérgico D1 pós-natal altera o comportamento de análise de risco de animais pré-púberes no teste do labirinto em cruz elevado*

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) tem paradigma bem estabelecido e vem sendo utilizado na avaliação do comportamento tipo ansioso em roedores, aproveitando a tendência natural destes animais de explorar novos ambientes (BOURIN *et al.*, 2001; WALF; FRYE, 2007; BAILEY; CRAWLEY, 2017). Os camundongos têm a opção de passar o tempo nos braços abertos - desprotegidos - ou nos braços fechados - protegidos. Usualmente áreas abertas

e iluminadas são aversivas, e este conflito entre explorar e evitar resulta em comportamentos já correlacionados às manifestações fisiológicas do estresse (HOLMES *et al.*, 2003).



**Figura 11:** Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. (A) Porcentagem de entradas no braço aberto; (B) Porcentagem de tempo nos braços abertos; (C) Tempo no centro do aparato, em segundos; (D) Número de rearings; (E) Número de Head dippings; (F) Número de Stretchings. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  # $P < 0,1$ .

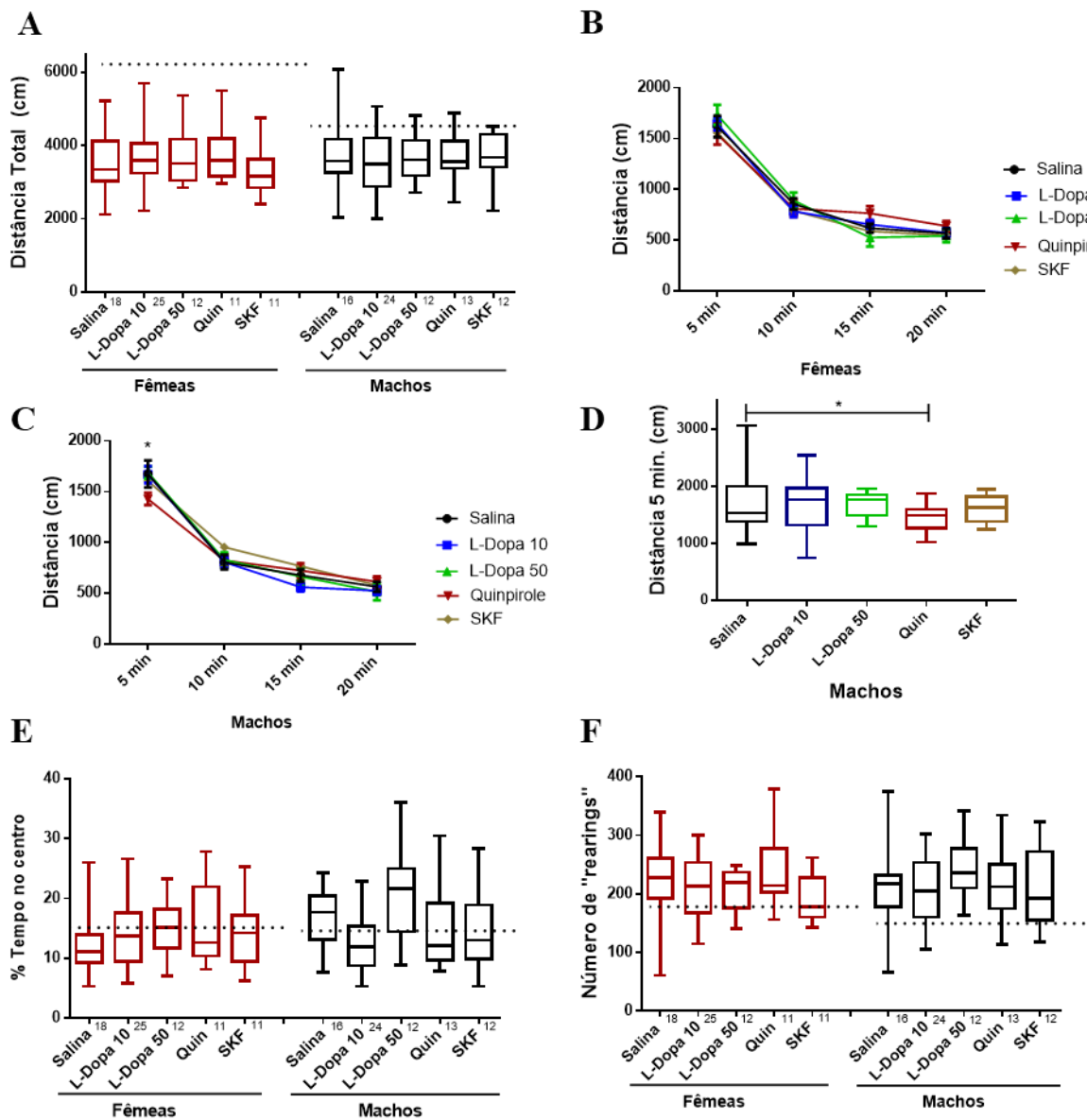
Diversos estudos têm relacionado alterações na sinalização dopaminérgica à manifestações de ansiedade (SOARES-CUNHA *et al.*, 2018; LODGE; GRACE, 2011; JIN *et al.*, 2015). Diante destes dados, utilizamos o labirinto em cruz elevado para testar se nosso protocolo de aumento do tônus dopaminérgico nos cinco primeiros dias de vida dos animais foi capaz de alterar o fenótipo comportamental com relação a manifestações tipo ansiosas.

Dentre os parâmetros clássicos (Figura 11 A, B e C), não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F=1,486$   $P=0,21$  One Way ANOVA para fêmeas e  $H=4,809$  e  $P=0,308$  One Way ANOVA on Ranks para machos). Quanto ao tempo de permanência nos braços abertos, foi observada diferença apenas entre os grupos L-Dopa 50 e Quinpirole para fêmeas ( $H=12,514$   $P=0,014$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn) e nenhuma diferença significativa foi observada nos machos ( $H=8,235$   $P=0,083$  One Way ANOVA on Ranks). Machos que receberam SKF 38393 no período pós-natal permaneceram menos tempo no quadrado central do labirinto quando comparados aos grupos L-Dopa 10 e L-Dopa 50 ( $F=4,744$   $P=0,03$  e  $P=0,012$  respectivamente, One Way ANOVA/Tukey) e quando comparados ao grupo salina ( $P=0,083$ ).

Buscando evidenciar possíveis diferenças em outros padrões de comportamento, foram avaliados também os parâmetros etológicos “Número de Rearings”, “Número de Head Dippings” e “Número de Stretchings”, que são considerados avaliação de risco (Figura 11 D, E e F). Não foram evidenciadas diferenças significativas no Número de Rearings ( $F=0,465$   $P=0,761$  One Way ANOVA para fêmeas e  $F=2,490$  e  $P=0,051$  One Way ANOVA para machos). Quanto ao Número de Head Dippings, para fêmeas a administração de SKF pós natal reduz este comportamento aos 30 dias de vida ( $F=3,710$   $P=0,022$  One Way ANOVA/Tukey) enquanto para os machos foi vista apenas diferença entre os grupos L-Dopa 10 e Quinpirole ( $H=13,299$  One Way ANOVA on Ranks, Dunn’s  $P<0,05$ ). Com relação ao Número de Stretchings, para fêmeas foi demonstrada diferença entre o grupo Quinpirole e os demais grupos que tiveram aumento do tônus dopaminérgico ( $H=20,371$  One Way ANOVA on Ranks, Dunn’s  $P<0,05$ ). Para os machos, animais que receberam SKF no período pós-natal tiveram redução deste comportamento ( $H=16,813$  One Way ANOVA on Ranks, Dunn’s  $P<0,05$ ).

*2.4.1.b. A administração de quinpirole no período pós-natal altera o comportamento exploratório apenas de camundongos pré-púberes machos no teste da caixa de atividade.*

O teste da caixa de atividades tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade motora como uma reação a um ambiente desconhecido, isto é, a locomoção motivada pela exploração. O fato do animal ser temporariamente isolado do grupo durante o teste e o ambiente novo são fatores ansiogênicos então, assim como o labirinto em cruz elevado, esse método é baseado na medição do comportamento de abordagem e evitação. (ROTH; KATZ, 1979; PRUT; BELZUNG, 2003; KULESSKAYA; VOIKAR, 2014).



**Figura 12:** Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal no teste da caixa de atividades em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. (A) Distância total percorrida, em centímetros; (B) Distância total percorrida, em centímetros a cada 5 minutos de teste para fêmeas; (C) Distância total percorrida, em centímetros a cada 5 minutos de teste para machos; (D) Destaque da distância percorrida pelos machos nos primeiros 5 minutos de teste; (E) Porcentagem de tempo passado no centro da arena; (F) Número de rearings. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \*P<0,05

A avaliação da atividade locomotora através do teste da caixa de atividades é base para a interpretação de outros testes comportamentais nos quais a capacidade locomotora do animal poderia induzir um viés de interpretação. Os resultados não evidenciaram alterações na atividade locomotora global em consequência da administração de L-Dopa, quinpirole ou SKF 38393 (H=3,701 P=0,448 One Way ANOVA on Ranks para fêmeas e F=0,129 P=0,971 One Way ANOVA para machos) (Figura 12A). Entretanto, ao dividir o teste em 4 intervalos de 5 minutos, foi possível perceber que machos que receberam Quinpirole no período pós-natal exibem menor atividade locomotora/exploratória nos primeiros 5 minutos de teste (P=0,0482 Two Way ANOVA – Dunnett) (Figura 12B, C e D). Ao fracionar os resultados do teste em períodos é possível analisar como o animal reage em fases distintas do experimento. A fase inicial é mais ansiogênica pelo isolamento do grupo e pelo ambiente desconhecido. Os resultados desta fase permitem inferir como o animal reage frente a um conjunto de estímulos estressores e sua capacidade de adaptação a um novo ambiente.

A avaliação da porcentagem de tempo que os animais passam no centro da caixa de teste não revelou diferenças significativas entre as fêmeas (Figura 12E) (H=3,889 P=0,421 One Way ANOVA on Ranks). Quanto ao número de rearings, parâmetro que se refere à exploração vertical do ambiente, não foram evidenciadas diferenças significativas para fêmeas ou machos (F=1,814 P=0,136 One Way ANOVA para fêmeas e F=0,850 P=0,498 One Way ANOVA para machos) (Figura 12F).

#### *2.4.1.c. Administração de quinpirole e SKF 38393 no período pós-natal altera somente o comportamento de machos pré-púberes no teste do nado forçado*

O teste do nado forçado, descrito originalmente por Porsolt *et al.* (1978), é o modelo mais amplamente utilizado para avaliar a atividade antidepressiva farmacológica e comportamento tipo depressivo. O teste baseia-se na observação de que os roedores apresentam a imobilidade quando são colocados no cilindro de água depois de interromperem comportamentos de fuga ativos, como escalar ou nadar. Os tratamentos antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade, ou retardam seu início, e aumentam ou prolongam os comportamentos de fuga ativos exibidos durante o teste. Acredita-se que o comportamento de imobilidade reflete a incapacidade de persistir no comportamento dirigido à fuga após o estresse (ou seja, o desespero comportamental) ou o desenvolvimento de comportamento passivo, que bloqueia o animal das formas ativas de enfrentamento do estresse (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; PETIT-

DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005; SLATTERY; CRYAN, 2012; POWELL; FERNANDES; SCHALKWYK, 2012; COSTA *et al.*, 2013).

A motivação, a psicomotricidade, a concentração e a capacidade de sentir prazer estão intrinsecamente interligadas e são reguladas em parte por circuitos contendo DA no sistema nervoso central. O comprometimento dessas funções são características proeminentes do transtorno depressivo, o que conecta o sistema dopaminérgico à fisiopatologia da depressão (DUNLOP; NEMEROFF, 2007; CHAUDHURY *et al.*, 2013; TYE *et al.*, 2013). Diante disso, utilizamos o teste do nado forçado para verificar se a administração de agonistas dopaminérgicos nos cinco primeiros dias de vida leva à manifestação de comportamentos tipo depressivos em camundongos machos e fêmeas pré-púberes.

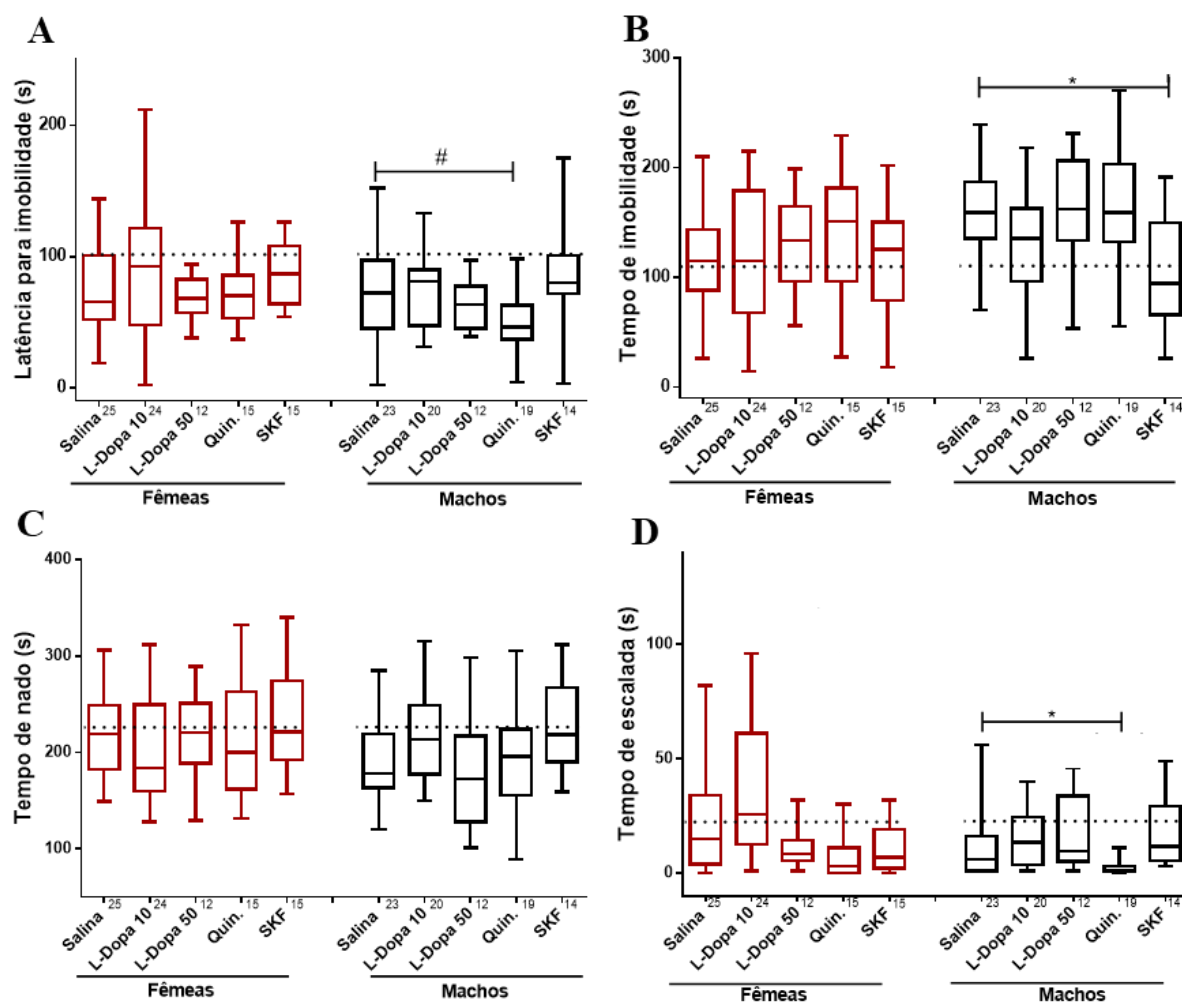
Na avaliação da latência para o primeiro episódio de imobilidade não houve diferença significativa entre as fêmeas ( $H=3,445$   $P=0,486$  One Way ANOVA on Ranks). Entre os machos foram detectadas diferenças entre os grupos L-Dopa 10 x quinpirole e SKF x quinpirole, além de uma redução da latência pelo grupo que recebeu quinpirole no período pós-natal (One Way ANOVA on Ranks/Dunn  $P<0,05$ ) (Figura 13A).

Quanto ao tempo total de imobilidade contabilizado durante os seis minutos de teste, também não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos das fêmeas ( $F=0,534$   $P=0,711$  One Way ANOVA). Para os machos foi verificado que a administração de SKF 38393 no período pós-natal levou à redução do tempo total de imobilidade. Além disso, também foram detectadas diferenças entre os grupos L-Dopa 50 e quinpirole x SKF ( $F=3,841$   $P<0,05$  One Way ANOVA) (Figura 13B).

Também foi mensurado o tempo total de nado dos animais durante o teste. Neste caso não foram detectadas diferenças significativas entre as fêmeas ( $F=1,036$   $P=0,393$  One Way ANOVA) e nem entre os machos ( $F=2,520$   $P=0,047$  One Way ANOVA/Tukey) (Figura 13C).

Com o intuito de refinar os resultados e buscando possíveis alterações mais sutis no comportamento dos animais, também foram avaliadas a frequência de expressão de determinados comportamentos, bem como a razão entre a frequência e o tempo de manifestação dos mesmos.

A análise do tempo total em que os animais demonstraram o comportamento de escalada revelou, para as fêmeas, apenas diferenças entre os grupos L-Dopa 10 x quinpirole e SKF ( $H=20,173$   $P<0,05$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn). Entre os machos a administração de quinpirole no período pós-natal foi capaz de reduzir drasticamente este comportamento ( $H=25,429$   $P<0,05$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn) (Figura 13D).

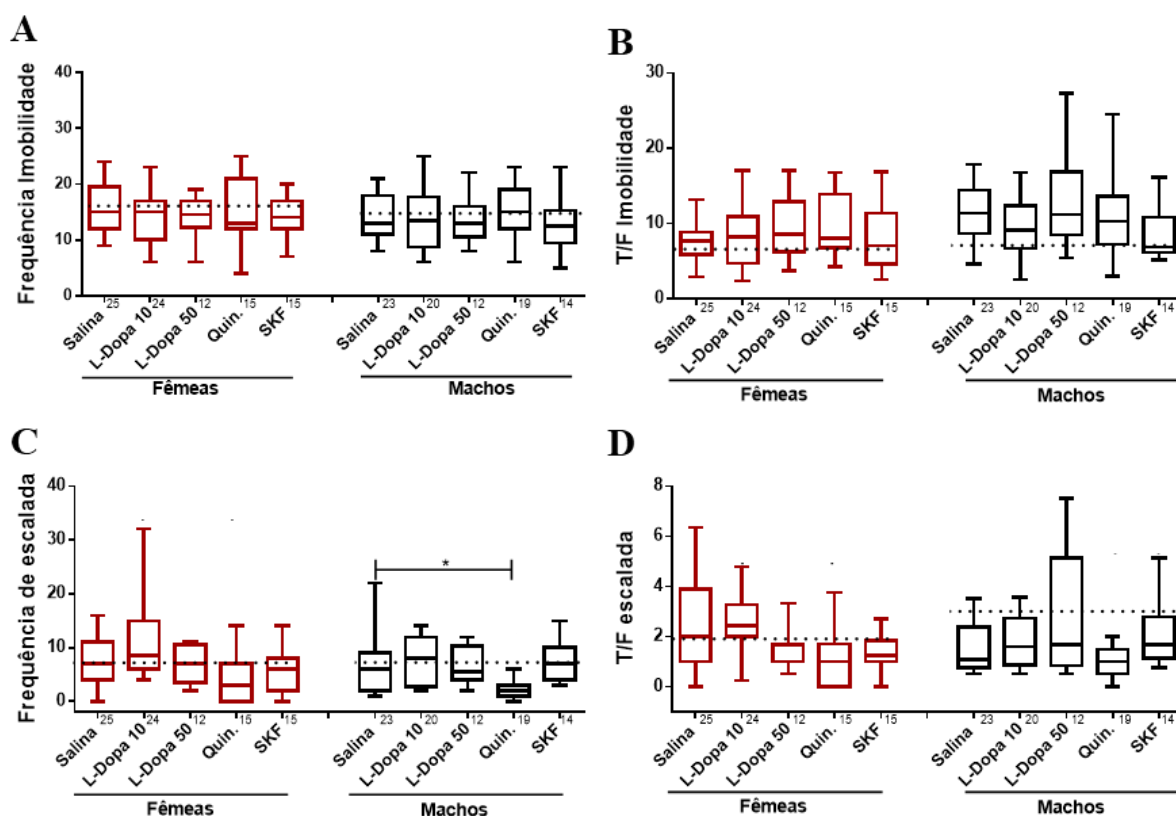


**Figura 13:** Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal no teste do nado forçado em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. (A) Latência para primeiro episódio de imobilidade, em segundos; (B) Tempo total de imobilidade durante o teste, em segundos (C) Tempo total de nado durante o teste, em segundos; (D) Tempo total de escalada durante o teste, em segundos. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \* $P < 0,05$  # $P < 0,1$ .

A análise da frequência de comportamento de imobilidade não evidenciou diferenças significativas para fêmeas ou machos ( $F=0,482$   $P=0,749$  One Way ANOVA para fêmeas e  $F=0,760$   $P=0,554$  One Way ANOVA para machos) (Figura 14A). O mesmo ocorreu com a razão tempo/frequência ( $H=2,449$   $P=0,654$  One Way ANOVA on Ranks para fêmeas e  $H=7,710$   $P=0,103$  One Way ANOVA on Ranks para machos) (Figura 14B).

Quanto à frequência do comportamento de escalada, para fêmeas foi detectada apenas diferença entre os grupos L-Dopa 10 x quinpirole ( $H=16,864$   $P < 0,05$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn). Entre os grupos dos machos, animais que receberam quinpirole no período pós-natal exibiram menor frequência deste comportamento ( $H=27,092$   $P < 0,05$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn) (Figura 14C).





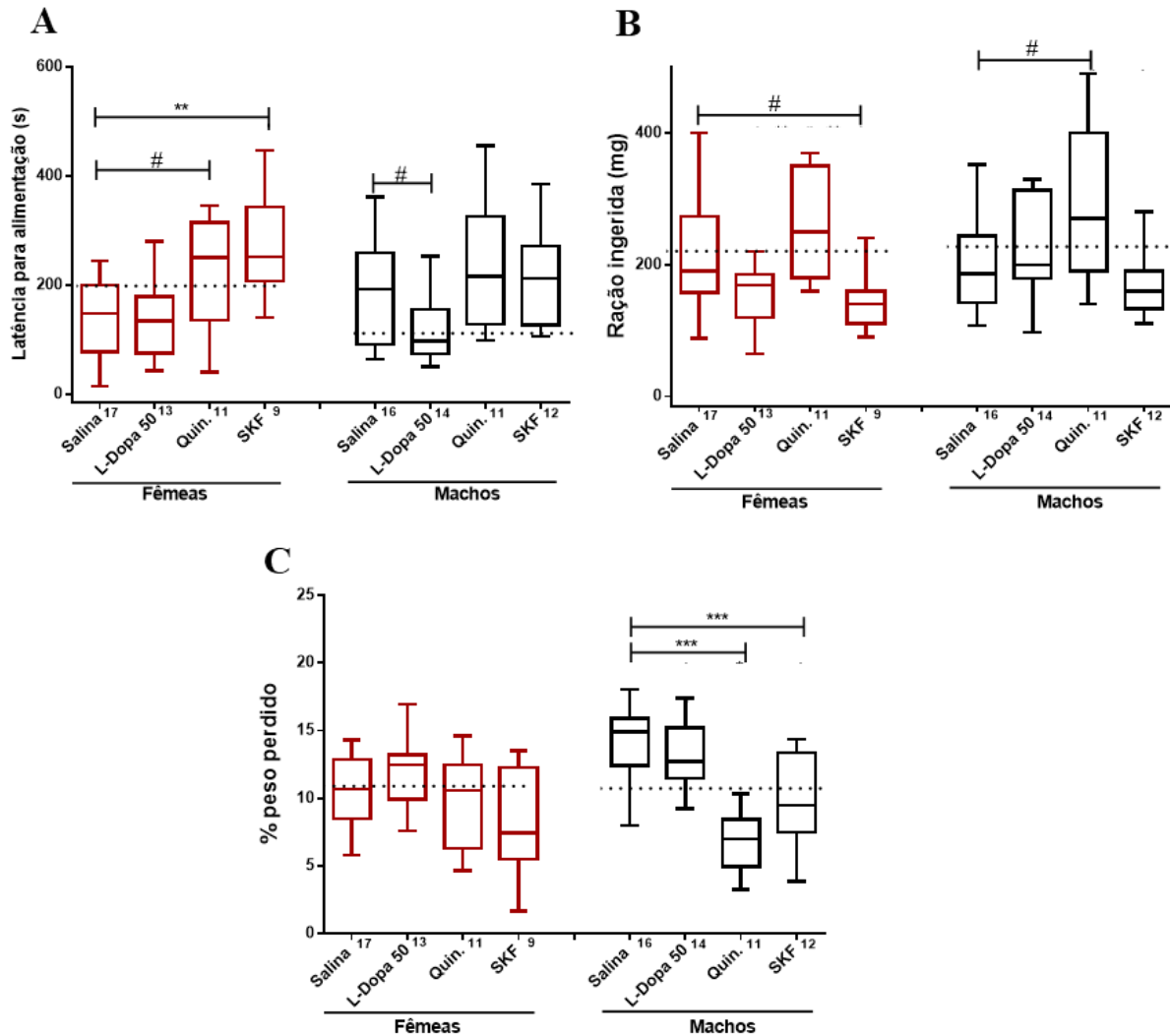
**Figura 14:** Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal no teste do nado forçado em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. (A) Frequência de episódios de imobilidade; (B) Razão Tempo/Frequência de imobilidade; (C) Frequência de episódios de comportamento de escalada; (D) Razão Tempo/Frequência de escalada. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \* $P < 0,05$

Com relação à razão tempo/frequência do comportamento de escalada; para fêmeas foi novamente detectada apenas a diferença entre os grupos L-Dopa 10 x quinpirole ( $H=12,978$   $P < 0,05$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn). Para os machos foi estatisticamente significativa somente a diferença entre os grupos quinpirole x SKF ( $H=11,998$   $P < 0,05$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn) (Figura 14D).

#### 2.4.1.d. O aumento do tônus dopaminérgico pós-natal altera o comportamento de machos e fêmeas pré-púberes no teste da neofagia

Os testes de “alimentação suprimida pela novidade” neofagia avaliam a ansiedade numa situação em que existe um conflito entre a recompensa alimentar e um ambiente aversivo. Durante o teste da neofagia mede-se a latência de um animal para aproximar-se e ingerir o alimento em um ambiente novo, mais amplo que sua caixa habitual, mais iluminado e após um longo período (até 24 horas) de privação de alimento. A proposta é capturar e mensurar o

conflito entre se aproximar e consumir o alimento desejável ou evitar a exploração de um novo ambiente com características ansiogênicas (POWELL; FERNANDES e SCHALKWYK, 2012; BLASCO-SERRA *et al.*, 2017).



**Figura 15:** Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal no teste de neofagia em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. (A) Latência para início da alimentação (s). (B) Quantidade de ração ingerida (mg) nos 10 minutos que se seguiram ao início da alimentação. (C) Porcentagem de peso perdido durante o período de privação de alimento que antecede o teste. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \* $P < 0,05$ .

O primeiro parâmetro analisado foi a latência para iniciar a alimentação. Entre os grupos das fêmeas foi observado que a administração de SKF 38393 no período pós-natal levou a um aumento da latência ( $P=0,002$ ) e quinpirole teve efeito similar ( $P=0,050$ ), enquanto L-Dopa não causou alterações ( $F=7,827$  One Way ANOVA/Tukey). Quanto aos machos, a latência foi reduzida nos animais que receberam L-Dopa nos cinco primeiros dias de vida ( $F=4,312$ ;  $P < 0,05$  One Way ANOVA/SNK) (Figura 15A).

A avaliação da quantidade de ração ingerida nos dez minutos seguintes ao início da alimentação mostrou que tanto animais que receberam SKF 38393 ( $P=0,053$ ) quanto L-Dopa ( $P=0,090$ ) apresentaram menor ingesta de alimento entre os grupos de fêmeas ( $F=7,059$  One Way ANOVA/Tukey). Entre os machos, foi observado que a administração de quinpirole no período pós-natal levou à ( $P=0,062$ ) maior consumo de alimento ( $F=3,911$  One Way ANOVA/Tukey) (Figura 15B).

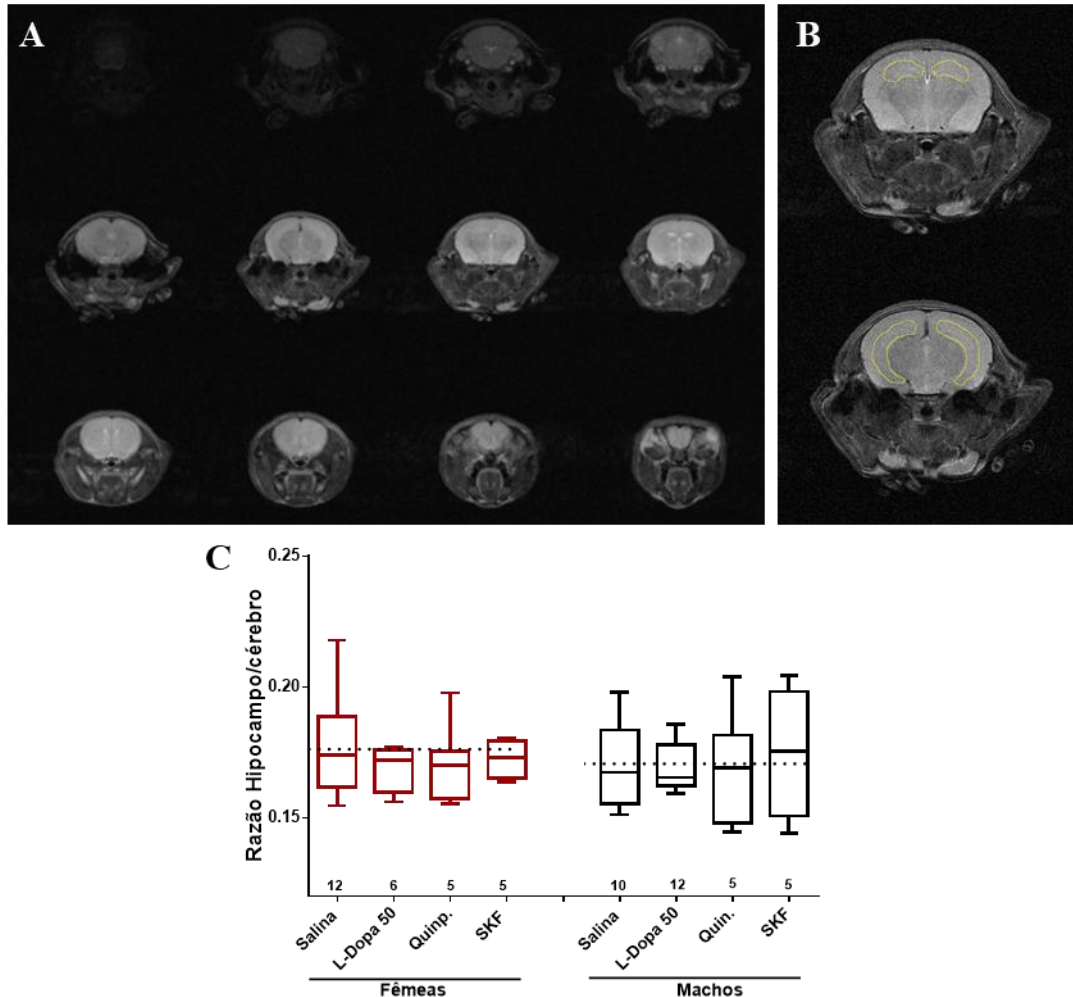
Durante a fase de padronização do teste de neofagia foi observada a necessidade de adaptar o período de privação de alimento em relação aos protocolos clássicos, devido à idade e peso dos animais utilizados neste trabalho. Em função desta alteração na metodologia do teste, incluímos um parâmetro de análise – a porcentagem de peso perdido pelos animais durante o período de jejum. Entre as fêmeas foi observada diferença significativa apenas entre os grupos L-Dopa e SKF ( $F=2,883$   $P=0,028$  One Way ANOVA/Tukey). Entre os machos, foi verificado que os animais que receberam os agonistas dopaminérgicos quinpirole e SKF 38393 no período pós-natal apresentaram perda de peso significativamente menor ( $F=19,925$   $P<0,05$  One Way ANOVA/Tukey) (Figura 15C).

#### **2.4.2. O aumento do tônus dopaminérgico no período pós-natal não causa alterações no volume total do hipocampo de camundongos pré-púberes**

O hipocampo desempenha papel importante nas emoções, na cognição, navegação espacial, aprendizagem e memória. Estudos têm demonstrado alterações no volume hipocampal em uma série de condições, a maioria das quais relacionada a patologias neuropsiquiátricas. Hajek; Carrey e Alda, (2005) realizaram ampla revisão da literatura e concluíram que possíveis candidatos para fatores de risco neuroanatômicos para transtorno bipolar são anormalidades volumétricas no hipocampo. Murray *et al.*, (2004) e Van Erp *et al.*, (2016) reportaram redução no volume do hipocampo e outras estruturas subcorticais em pacientes com esquizofrenia.

Diante destes dados, julgamos ser relevante a pesquisa por alterações morfométricas no hipocampo dos animais que passaram por protocolo de aumento do tônus dopaminérgico no período pós-natal. Foi avaliado o volume do hipocampo em relação ao volume do cérebro de cada animal nas imagens analisadas. A Figura 16A mostra o conjunto de imagens obtido para cada animal submetido ao teste, enquanto na Figura 16B foi destacada a marcação do hipocampo dorsal e ventral. Nossos resultados mostraram que o protocolo aplicado não causa

alterações detectáveis no volume do hipocampo para machos ou fêmeas ( $F=0,504$   $P=0,683$  One Way ANOVA para fêmeas e  $F=0,123$   $P=0,945$  One Way ANOVA para machos) (Figura 16C).



**Figura 16:** Administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal não altera o volume hipocampal de camundongos machos e fêmeas pré-púberes. (A) Imagens de Ressonância Magnética Estrutural (RME) do cérebro total (B) Destaque das imagens de RME do hipocampo. (C) Gráfico dos resultados obtidos. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot.

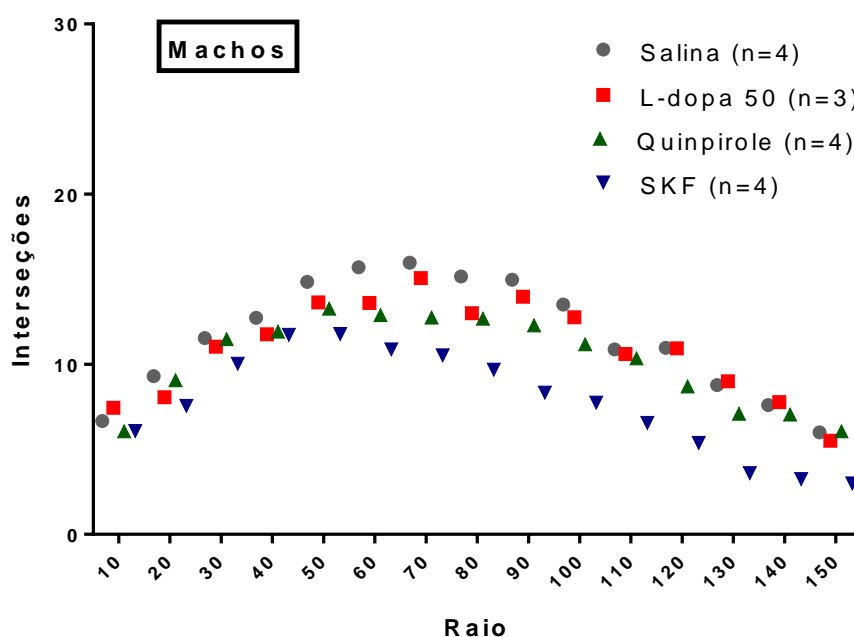
### 2.4.3. Administração de SKF 38393 no período pós-natal reduz a arborização dendrítica apenas no hipocampo de fêmeas pré-púberes

Devido às limitações técnicas do equipamento de ressonância magnética estrutural, buscamos outras metodologias para analisar possíveis alterações microestruturais no hipocampo dos camundongos que passaram pelo protocolo de aumento do tônus dopaminérgico no período pós-natal. O método de coloração de Golgi-Cox é consistente, tem baixo custo e

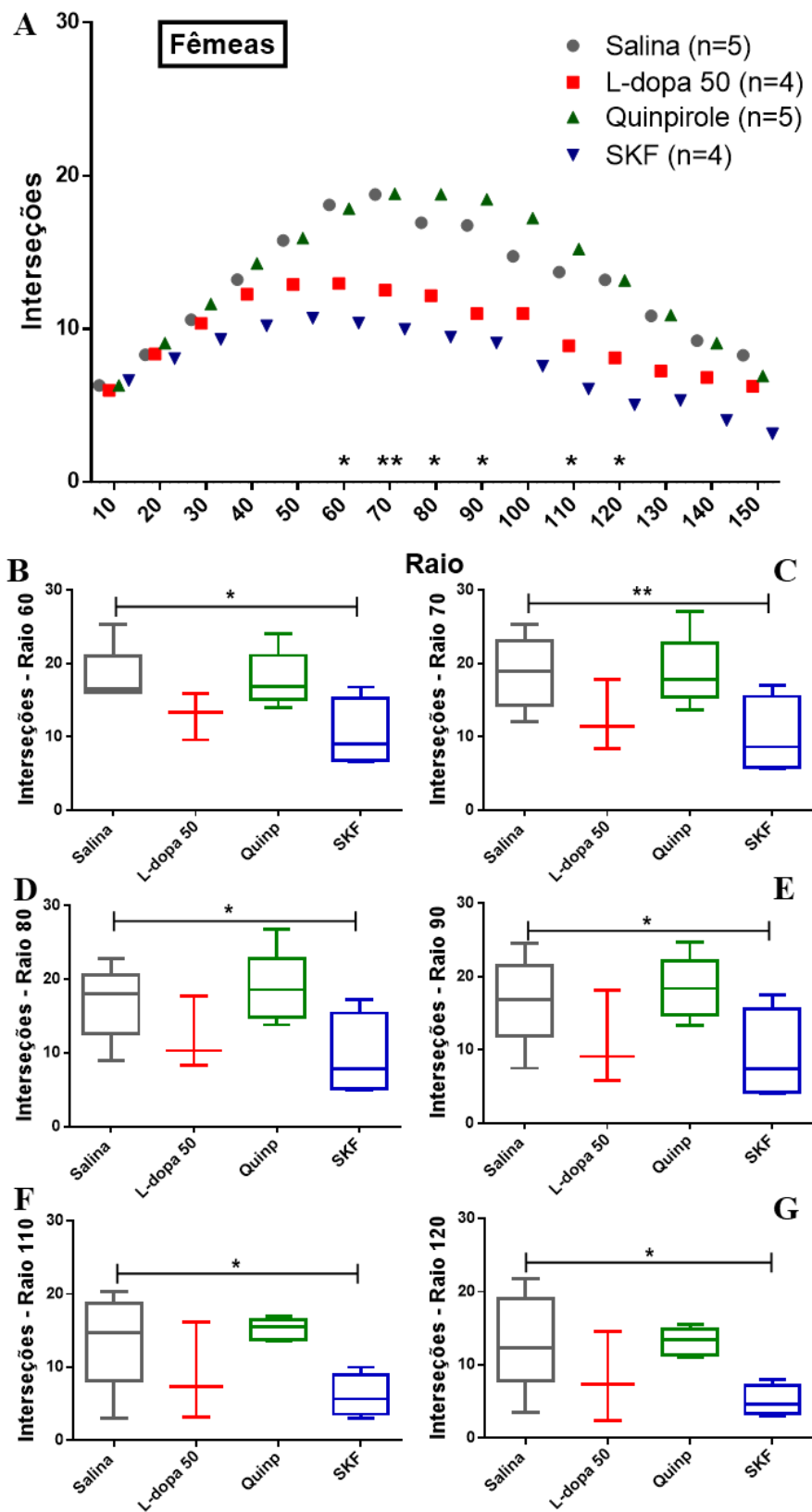
sensibilidade o bastante para permitir a visualização e análise da arborização axonal e dendrítica; e também dos espinhas dendríticas (Figura 10) (RANJAN; MALLICK, 2010).

Na Figura 18A é apresentado o resultado da análise da arborização neural do hipocampo das fêmeas, com raio máximo de 150  $\mu\text{m}$ . A administração de SKF 38393 nos cinco primeiros dias de vida levou à redução da arborização, sendo as diferenças estatisticamente significativas entre os raios 60 e 120 (Two Way ANOVA/Tukey  $p < 0,05$ ). As Figura 18 B a G destacam as diferenças detectadas. Para os machos não houve diferenças significativas, como pode ser visto na Figura 17 (Two Way ANOVA).

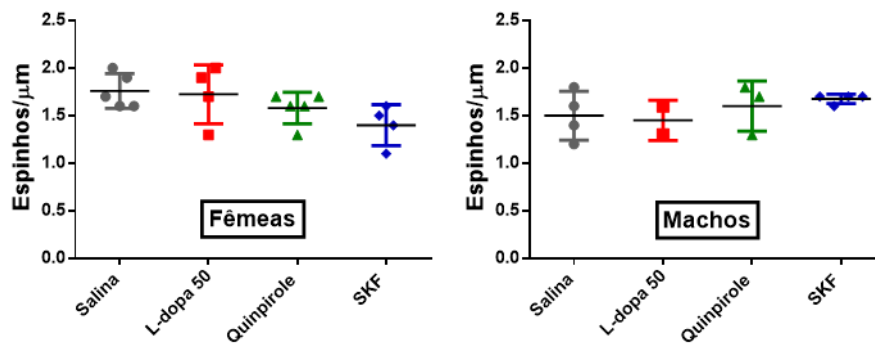
Quanto ao número de espinhas dendríticas/ $\mu\text{m}$ , não foram encontradas diferenças para fêmeas ( $F=1,605$   $P=0,182$  One Way ANOVA) ou para machos ( $F=0,7276$   $P=0,561$  One Way ANOVA), vide Figura 19.



**Figura 17:** Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal na arborização dendrítica do hipocampo de camundongos machos pré-púberes. O número de animais em cada grupo está indicado na legenda.



**Figura 18:** Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal na arborização dendrítica do hipocampo de camundongos fêmeas pré-púberes. (A) Visão geral (B a G) Destaque dos raios nos quais a diferença foi estatisticamente significativa. O número de animais em cada grupo está indicado na legenda da Figura A. \*P<0,05; \*\*P<0,01



**Figura 19:** Efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos durante o período pós-natal na formação de espinhas dendríticas no hipocampo de camundongos fêmeas e machos pré-púberes.

## 2.5 DISCUSSÃO

O teste do labirinto em cruz elevado é amplamente utilizado para detectar e mensurar fenótipos comportamentais de ansiedade em roedores, por isso foi escolhido para avaliar se o aumento do tônus dopaminérgico nos cinco primeiros dias de vida dos camundongos seria capaz de alterar este padrão de comportamento. Seo e Kuzhikandathil (2015) sugerem que o receptor dopaminérgico D3 está envolvido na etiologia de comportamentos relacionados à ansiedade e depressão em camundongos adultos que passaram por experiências estressantes repetidas durante a infância. CHAN *et al.* (2017) demonstraram em seus experimentos que a ativação e inibição do receptor dopaminérgico D1, mas não de D2, na habênula lateral aumentou o comportamento tipo ansioso em ratos.

Não foram detectadas alterações de comportamento de fêmeas ou machos nos parâmetros clássicos “Porcentagem de entradas nos braços abertos” ou “Porcentagem de tempo nos braços abertos”. A análise de outros parâmetros etológicos, entretanto mostrou alterações relevantes. Fêmeas que receberam o agonista D1 SKF 38393 no período pós-natal exibiram menor frequência do comportamento “head dippings”, e nos machos esta substância levou a menor tempo de permanência no centro do aparato e redução da frequência de “stretchings”, comportamentos classificados como “avaliação de risco”.

Comportamentos de avaliação de risco foram inicialmente caracterizados por Blanchard e Blanchard (1989), utilizando um sistema de tocas visíveis, no qual as reações defensivas naturais de ratos a um gato poderiam ser estudadas em detalhes. Após uma breve aparição do predador, os ratos rapidamente fugiam para os túneis/câmaras mais distantes, onde manifestavam congelamento (freezing) e vocalizações ultrassônicas por pelo menos 30 minutos. A saída dos túneis era gradualmente retomada ao longo das próximas 4 horas, e acabou

sendo visto como um padrão de comportamento denominado "avaliação de risco". Esse padrão compreende uma abordagem cautelosa pelas aberturas de túneis, e está associado a elementos posturais específicos, como posturas planas de apoio/alongamento (stretchings). Comportamentos semelhantes foram relatados em resposta a um estímulo de choque e odores específicos, e é proposto que sua principal função é coletar informações sobre possíveis fontes de perigo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; RODGERS; DALVI, 1997).

Manipulações ansiogênicas (farmacológicas e não-farmacológicas) aumentam as medidas de avaliação de risco, enquanto reduzem outros comportamentos. Isso demonstra que medidas de avaliação de risco podem ser usadas para diferenciar perfis comportamentais ansiogênicos de não específicos. Os efeitos ansiogênicos podem ser revelados através de aumentos na avaliação de risco, mesmo na ausência de mudanças nas medidas mais convencionais (ANDREWS; FILE, 1993; RODGERS; DALVI, 1997).

Considerando estas informações e os resultados obtidos, pode-se afirmar que a administração de SKF 38393 no período pós-natal teve efeito ansiolítico para machos e fêmeas pré-púberes no teste do labirinto em cruz elevado, evidenciado pela redução de comportamentos de avaliação de risco.

O teste da caixa de atividades tem como propósito avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais, bem como o perfil de ansiedade, que pode ser acessado pela medida do tempo de permanência no centro do aparato, longe das paredes. A avaliação da capacidade locomotora dos animais é base para a análise dos outros testes comportamentais. Nossos resultados não mostraram alterações na distância total percorrida, tempo de permanência no centro da caixa ou número de rearings, para machos ou fêmeas que receberam L-Dopa, quinpirole ou SKF no período pós-natal. Entretanto, ao fracionar o teste em períodos, percebemos que os machos que receberam quinpirole percorreram uma distância menor nos primeiros cinco minutos, indicando que estes animais se adaptam a um novo ambiente de modo diferente dos demais grupos.

A flexibilidade cognitiva é a habilidade de detectar mudanças nas contingências de estímulo - feedback. Requer o reconhecimento da irrelevância de uma resposta e capacidade de resposta a uma nova contingência de estímulo/recompensa. Devido à sua importância para muitas condições psiquiátricas, incluindo esquizofrenia, transtorno do espectro obsessivo-compulsivo (TOC), abuso de substâncias, autismo e devido à necessidade de bom funcionamento desta habilidade frente às mudanças ambientais, a flexibilidade cognitiva se tornou alvo de intenso estudo no domínio cognitivo (HATALOVA *et al.*, 2014).



A sensibilização ao quinpirole não está associada à estereotipia dos movimentos corporais, mas apenas com estereotipia e verificação do caminho em campo aberto enriquecido. Com base na semelhança entre o comportamento sensibilizado por quinpirole em ratos e sintomas obsessivo-compulsivos em humanos, foi proposto que esta sensibilização pode servir como um modelo de TOC. Além disso, os efeitos comportamentais da administração crônica de quinpirole mimetizam algumas das características comportamentais da esquizofrenia. A sensibilização pelo quinpirole altera os níveis de DA na substância negra, estriado e córtex pré-frontal, e altera a ligação dos receptores D2 e D3 no nucleus accumbens, pálido ventral e na substância negra (HOLMES; LACHOWICZ; SIBLEY, 2004; SMILLIE; WACKER, 2014; EAGLE *et al.*, 2014; HATALOVA *et al.*, 2014; CAMPOS-GARCÍA ROJAS *et al.*, 2015).

Considerando que nossos animais receberam injeções de quinpirole por cinco dias consecutivos em uma janela de desenvolvimento rica em eventos, uma hipótese levantada é que as alterações geradas na sinalização dopaminérgica relativas ao receptor D2 tenham afetado o comportamento de flexibilização cognitiva, o que justifica a menor distância percorrida no período inicial do teste da caixa de atividades.

Buscando verificar se a administração de L-Dopa, quinpirole ou SKF 38393 no período pós-natal leva a alterações no substrato neural com reflexos no comportamento tipo depressivo aos 30 dias de vida, foi realizado o teste do nado forçado. A latência para o primeiro episódio de imobilidade foi reduzida pelo quinpirole em machos, assim como o tempo e a frequência do comportamento de escalada. Ainda para os machos, a administração de SKF levou à redução do tempo total de imobilidade. Para as fêmeas não foram evidenciadas alterações significativas entre o grupo controle e os demais. Tomados em conjunto, estes dados permitem inferir que enquanto a administração pós-natal de SKF 38393 teve um efeito de resiliência ao reduzir o tempo de imobilidade, quinpirole, ao contrário, levou a manifestações do fenótipo tipo depressivo em machos com a redução da latência para imobilidade, tempo e frequência do comportamento de escalada (CASTAGNÉ; PORSOLT; MOSER, 2009).

A habênula lateral é uma pequena estrutura de ligação entre o prosencéfalo e o mesencéfalo, sendo importante para o processamento emocional. Sabe-se que sua inativação reduz o comportamento semelhante à ansiedade em roedores, e tem sido sugerido que a atividade anormal da habênula lateral está ligada ao comportamento tipo depressivo. Além disso, ela está reciprocamente conectada com a área tegmental ventral, atuando como um centro regulatório para os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (CHRISTOPH; LEONZIO;

WILCOX, 1986; GILL *et al.*, 2013; PROULX; HIKOSAKA; MALINOW, 2014; MATHIS *et al.*, 2015; TIAN; UCHIDA, 2015).

Chan *et al* (2017) realizaram injeções bilaterais de SCH 23390 (antagonista D1) e SKF 38393 (agonista D1) nas habênulas laterais. Após 24 horas os ratos passaram pelo teste do nado forçado. Os animais que receberam SCH ou SKF mostraram menor tempo de imobilidade em comparação com o grupo salina, sugerindo que a ativação ou inativação do receptor dopaminérgico D1 antagoniza o comportamento tipo depressivo induzido pelo nado forçado. eticloprida (antagonista D2) ou o quinpirole (agonista D2) não levaram a diferenças no tempo de imobilidade quando comparados com os controles (CHAN *et al.*, 2017).

Receptores dopaminérgicos D1 e D2 têm padrões de expressão e vias de sinalização diferentes no cérebro. Esses dois tipos de receptores também diferem centenas de vezes na afinidade pela DA. Assim, o papel dos receptores D1 e D2 no processamento emocional varia em diferentes áreas do cérebro. Por exemplo, SCH23390, um antagonista D1, tem efeito ansiolítico se injetado no nucleus accumbens, mas efeito ansiogênico se injetado na amígdala (SCHULTZ, 2007; ZARRINDAST *et al.*, 2011; ZARRINDAST *et al.*, 2012; SCHULTZ, 2013).

Já eram esperados resultados sexualmente dimórficos no teste do nado forçado (KOKRAS *et al.*, 2015), assim como correlações com testes que mensuram ansiedade (ANYAN; AMIR, 2018). SKF 38393 mostrou efeito protetor tanto para ansiedade como para depressão nos machos, enquanto quinpirole teve efeito oposto. Neste protocolo os animais receberam as substâncias por injeções intraperitoneais não sendo possível, portanto, delimitar seu local de ação. Além disso, os resultados obtidos não retratam um efeito agudo, mas sim o resultado global de uma interferência em uma janela de desenvolvimento do sistema nervoso central.

O teste da hiponeofagia (alimentação suprimida por novidade) é mais uma abordagem usada para avaliar o comportamento tipo ansioso em roedores (CALHOON; TYE, 2015). Diferente do labirinto em cruz elevado, que se baseia em padrões etológicos típicos dos roedores, na hiponeofagia a privação de alimento cria mais um fator motivacional para que o animal enfrente o ambiente ansiogênico.

Os resultados obtidos para as fêmeas demonstram que a administração de quinpirole e SKF no período pós-natal levou a um aumento da latência para alimentação, que pode ser interpretado como comportamento tipo ansioso. Para os machos, por sua vez, a administração de L-Dopa levou à redução da latência, indicando um efeito ansiolítico. Com relação à

quantidade de ração ingerida nos dez minutos seguintes ao primeiro episódio de alimentação, fêmeas que receberam L-Dopa ou SKF exibiram valores menores, enquanto a administração de quinpirole levou os machos a ingerirem mais ração. Foi avaliada ainda a porcentagem de peso perdido pelos animais no período de privação alimentar que antecede o teste. Enquanto para as fêmeas não foram detectadas diferenças significativas, para os machos os agonistas quinpirole e SKF tiveram efeito protetor, fazendo com que estes animais perdessem menos peso.

Analisados conjuntamente, os resultados do teste de neofagia contrastam o efeito ansiolítico que a administração pós-natal de SKF 38393 já havia evidenciado no teste do labirinto em cruz elevado para as fêmeas. É possível que nestes testes sejam acessadas diferentes vias que levem à emergência do fenótipo de ansiedade. Quinpirole parece influenciar mais fortemente a adaptação delas ao novo ambiente, pois embora a latência para alimentação tenha aumentado, a quantidade ingerida foi semelhante à do grupo controle. Receptores dopaminérgicos D1 e D2 parecem estar diferencialmente envolvidos em processos relacionados ao apetite. De fato, a maioria dos agonistas do receptor tipo D2 tem efeitos recompensadores, conforme avaliado em procedimentos de autoadministração e preferência de lugar condicionado, enquanto os efeitos dos agonistas do receptor tipo D1 são menos nítidos (DUARTE *et al.*, 2003; SADEGHZADEH; BABAPOUR; HAGHPARAST, 2015). Já foi demonstrado também que a desnutrição perinatal aumenta o comportamento emocional do animal quando a recompensa alimentar é usada. Os testes revelaram um aumento na expressão gênica do receptor D1a no estriado ventral de animais desnutridos, e não houve alterações significativas em relação ao receptor D2, levando os autores à conclusão de que a desnutrição proteica perinatal estimula o controle hedônico do comportamento alimentar, promovendo o aumento da ingestão de alimentos saborosos, possivelmente devido ao aumento da expressão do receptor D1a no estriado ventral (DE MELO MARTIMIANO *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos até agora mostraram que a administração de L-Dopa, quinpirole e SKF 38393 nos cinco primeiros dias de vida de camundongos machos e fêmeas leva a alterações comportamentais aos trinta dias de vida, o que indica que a aplicação deste protocolo causa alterações em vias neurais específicas e possivelmente diferentes para machos e fêmeas. A Figura 20 mostra um resumo dos dados obtidos nos testes comportamentais. Os testes seguintes foram realizados com o intuito de localizar e mensurar estas alterações.

|     |   | D10 | D50         | SKF            | Quin         |
|-----|---|-----|-------------|----------------|--------------|
| LCE | ♀ | -   | -           | ansiolítico    | -            |
|     | ♂ | -   | -           | ansiolítico    | -            |
| CA  | ♀ | -   | -           | -              | -            |
|     | ♂ | -   | -           | -              | ↓ Locom. 5'  |
| NF  | ♀ | -   | -           | -              | -            |
|     | ♂ | -   | -           | antidepressivo | depressivo   |
| NEO | ♀ | -   | -           | ansio gênico   | ansio gênico |
|     | ♂ | -   | ansiolítico | -              | -            |

**Figura 20:** Resumo dos resultados obtidos nos testes comportamentais. D10: l-dopa 10 mg/kg. D50: l-dopa 50 mg/kg. LCE: teste do labirinto em cruz elevado. CA: teste da caixa de atividades. NF: teste do nado forçado. NEO: teste de neofagia.

No teste da ressonância magnética estrutural buscamos verificar se nosso protocolo era capaz de causar alterações morfométricas no hipocampo dos animais, condição encontrada em diversos transtornos neuropsiquiátricos. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre os grupos, mas ainda assim não descartamos a possibilidade de que existam alterações e não tenham sido detectadas devido às limitações técnicas do experimento. O equipamento utilizado foi um magneto de 4.7T NMR (Oxford Systems) controlado por console de imagens UNITY Inova-200 (Varian), que nos permitia fazer múltiplas varreduras coronais (TR=300ms, TE=50ms), 20 a 23 contínuas, com 1mm de espessura. Devido a impossibilidade de obter fatias com espessura menor que 1mm, não pudemos avaliar regiões específicas do cérebro, exceto o hipocampo. É possível que haja diferenças mais sutis, que não foram detectadas neste ensaio.

Buscando compensar as limitações da ressonância magnética estrutural, realizamos um teste baseado no método de Golgi-Cox para verificar possíveis alterações microestruturais na arborização axonal e dendrítica; e também nos espinhas dendríticas do hipocampo dos animais que passaram pelo protocolo. Os resultados mostraram que a administração do agonista D1 SKF 38393 no período pós-natal leva à redução da arborização axonal e dendrítica para as fêmeas aos trinta dias de vida, sendo que para os machos não foram detectadas alterações significativas.

O hipocampo é a estrutura cerebral primária relacionada tanto às emoções quanto à aprendizagem e à memória. Aferências dopaminérgicas para a formação hipocampal surgem tanto da área tegmental ventral quanto dos grupos de células dopaminérgicas da substância negra *pars compacta*. Estudos anteriores confirmaram que a DA modula funções dependentes do hipocampo, como aprendizado espacial e memória, detecção de novidade e processamento de contexto. Além disso, injeções intra-hipocampais de agonistas D1 e antagonistas D2 podem melhorar a memória, enquanto lesões que interrompem a entrada dopaminérgica no hipocampo

por 6-hidroxidopamina resultam em déficits na memória de trabalho espacial ou em acentuada deficiência na aquisição do comportamento de esquivo condicionado. (SCATTON *et al.*, 1980; PACKARD; WHITE, 1991; GASBARRI *et al.*, 1996; WILKERSON; LEVIN, 1999; LISMAN; GRACE, 2005; WEN *et al.*, 2015).

Com relação à quantificação de espinhas dendríticas no hipocampo, não foram detectadas diferenças significativas entre machos ou fêmeas. Entretanto, pretendemos ampliar o contingente amostral e subdividi-lo de acordo com as regiões e tipos de neurônios específicos, tomando por base as vias de sinalização conhecidas.

Pacientes que sofrem de esquizofrenia exibem déficits cognitivos significativos, que estão associados a anormalidades estruturais e funcionais no hipocampo. Nesta estrutura, o crescimento regular e a ramificação das sinapses são fundamentais para estabelecer os circuitos neuronais e as funções cerebrais normais. Já foram estabelecidas relações entre os déficits sinápticos e as deficiências cognitivas. A maioria das sinapses excitatórias é formada nos espinhas dendríticas, que são locais de plasticidade sináptica mediada por aumentos localizados de  $[Ca^{2+}]$  e regulação dinâmica do citoesqueleto de actina (MCKINNEY, 2010; GONZÁLEZ-BURGOS, 2012; HAN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013).

As alterações da densidade e morfologia dos espinhos podem ter consequências significativas para a função cerebral, como foi demonstrado em estudos baseados em modelos de estresse, desnutrição, toxinas e abuso de drogas (SEGAL, 2010; CHAKRABORTI *et al.*, 2012). Estudos post-mortem revelaram que a densidade de espinhas dendríticas no hipocampo de pacientes com esquizofrenia foi significativamente (~70%) menor (ROSOKLIJA *et al.*, 2000).

No trabalho de Todd (1992) foi investigado o papel dos receptores dopaminérgicos D2 no controle do crescimento de neuritos pela resposta dos neurônios corticais à estimulação *in vitro*. Numa percentagem pequena, mas significativa destes neurônios, a presença do agonista D2, quinpirole, resultou num aumento de três a dez vezes no comprimento dos neuritos e no número de pontos de ramificação por neurito. Estes efeitos foram bloqueados por antagonistas do receptor D2 (TODD, 1992). Este resultado reforça a ideia de que, dada a distribuição heterogênea dos receptores dopaminérgicos no cérebro, os efeitos do aumento do tônus dopaminérgico com agonistas D1 e D2 deve ter efeitos diferentes em regiões distintas.

Neste trabalho o tônus dopaminérgico foi aumentado repetidamente, nos cinco primeiros dias de vida dos animais, período de intensa atividade neural de formação de novas sinapses. Embora, novamente por limitações técnicas, não tenha sido ainda possível detectar

especificamente a região ou tipo celular alterados, pode-se perceber que o agonista D1 SKF 38393 interfere de maneiras diferentes no desenvolvimento do hipocampo de machos e fêmeas. Ainda não é possível afirmar se a natureza das alterações causadas pelo SKF é benéfica ou deletéria entretanto, nos testes comportamentais do labirinto em cruz elevado, caixa de atividades, nado forçado e neofagia, os machos tiveram alterações em um número maior de parâmetros avaliados, o que denota maior resiliência das fêmeas frente à intervenção aplicada neste protocolo. É válido salientar que na idade escolhida para realização dos testes comportamentais os animais ainda não entraram na puberdade, o que isola os efeitos do ciclo hormonal já conhecidos por alterar o perfil de espinhas dendríticas no hipocampo das fêmeas (GABOR *et al.*, 2015).

Em suma, a aplicação deste delineamento experimental demonstrou que:

- A administração de SKF 38393 nos 5 primeiros dias de vida teve efeito ansiolítico para machos e fêmeas no LCE, aumentou a resiliência dos machos no NF, teve efeito ansiogênico na NEO para machos e levou à redução da arborização neural das fêmeas aos 30 dias de vida.
- A administração pós-natal de quinpirole levou à redução da distância percorrida nos cinco primeiros minutos da CA e teve efeito depressivo para os machos no NF, enquanto para as fêmeas causou efeitos ansiogênicos na NEO.
- L-dopa 50mg/kg teve efeito ansiolítico para machos na NEO.

### **3. EFEITOS DO AUMENTO AGUDO DO TÔNUS DOPAMINÉRGICO NO COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS PRÉ-PÚBERES**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

A puberdade é um evento fisiológico que envolve a obtenção de capacidade reprodutiva e o desenvolvimento completo de órgãos sexuais e físicos. Mudar da infância para a idade adulta é um processo complexo e rigidamente controlado por vias de interconexão ao nível do hipotálamo, que podem ser influenciadas por fatores ambientais, psicossociais e endócrinos. (KHAN; BERGER; DE CATANZARO, 2008; KANE; ISMAIL, 2017; ALOTAIBI, 2019).

A adolescência, o período de transição entre a infância e a idade adulta, é caracterizada por mudanças substanciais na estrutura e atividade cerebral, particularmente em regiões que desempenham papéis-chave em comportamentos específicos desta faixa etária. O início da adolescência é delineado pela puberdade, caracterizado por alterações hormonais que dão origem a características sexuais secundárias. Vários estudos mostraram associações entre o desenvolvimento cerebral subcortical e características puberais. Pesquisas têm sugerido que a puberdade pode representar um (segundo) período reorganizacional no cérebro. Modelos animais já forneceram evidências diretas de que a puberdade representa um período crítico durante o qual os hormônios podem promover efeitos organizadores na estrutura cerebral (MILLS *et al.*, 2016; JURASKA; WILLING, 2017; WIERENGA *et al.*, 2018).

Dentre as alterações neuroanatômicas que marcam este período está a variação do volume do córtex pré-frontal medial. Em estudos com ratos, foi constatado que ambos os sexos perderam neurônios nesta região, mas as fêmeas tiveram perdas consideravelmente maiores que os machos, principalmente no período entre P35 e P45. O cíngulo anterior adjacente não apresentou diferenças em nenhum dos sexos entre P35 e P90, indicando que nem toda área cortical perde células durante a adolescência (MARKHAM; MORRIS; JURASKA, 2007).

A densidade de espinhas dendríticas também se altera na adolescência. Ratos machos e fêmeas tiveram uma diminuição na densidade de espinhas dendríticas entre P35 e P90. Porém, tanto as espinhas dendríticas quanto o comprimento total da árvore dendrítica aumentaram em ambos os sexos entre P20 e P35 (período juvenil) (KOSS *et al.*, 2014; WILLING; JURASKA, 2015).

A densidade de receptores de DA (D1 e D2) também é maior no período periadolescente do que em adultos no córtex pré-frontal de ratos, e a resposta eletrofisiológica à DA no córtex pré-frontal medial masculino sofre alterações drásticas durante a adolescência, com agonistas

D2 causando inibição leve pré-puberal (P36), mas forte excitação após a puberdade (P50) (ANDERSEN *et al.*, 2000; O'DONNELL, 2010).

Em nossa pesquisa, observamos efeitos do distúrbio dopaminérgico pós-natal no comportamento de camundongos pré-púberes. Também observamos alterações no número de ramificações dendríticas. Portanto, uma das nossas hipóteses é que a sinalização dopaminérgica dos camundongos pré-púberes estaria alterada pela exposição aos agonistas dopaminérgicos durante o desenvolvimento pós-natal. E para testar esta hipótese, decidimos utilizar ferramentas farmacológicas para desafiar o sistema dopaminérgico e investigar os efeitos comportamentais dos camundongos. Porém, a pré-puberdade é uma janela temporal carente de pesquisas fisiológicas e farmacológicas, incluindo o sistema dopaminérgico, talvez pela iminência das grandes alterações trazidas pela puberdade. Ao mesmo tempo, o alvo deste trabalho – o sistema dopaminérgico – já iniciou seu processo de maturação e passa por uma série de adaptações. Desta forma, antes de investigar as consequências do distúrbio dopaminérgico pós-natal na própria sinalização dopaminérgica pré-púbere, decidimos avaliar o perfil de resposta comportamental aos agonistas dopaminérgicos na pré-puberdade

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este procedimento experimental teve como objetivos específicos:

- Verificar os efeitos da administração aguda de L-Dopa e dos agonistas dopaminérgicos, quinpirole e SKF 38393 aos 30 dias de vida na atividade locomotora de camundongos machos e fêmeas, utilizando o teste da caixa de atividades.
- Avaliar os efeitos da administração aguda de L-Dopa e dos agonistas dopaminérgicos quinpirole e SKF 38393 aos 30 dias de vida no comportamento tipo ansioso de camundongos machos e fêmeas, utilizando o teste do labirinto em cruz elevado.
- Analisar os efeitos da administração aguda de L-Dopa e dos agonistas dopaminérgicos quinpirole e SKF 38393 aos 30 dias de vida de camundongos machos e fêmeas quanto ao comportamento tipo depressivo, utilizando o teste do nado forçado.



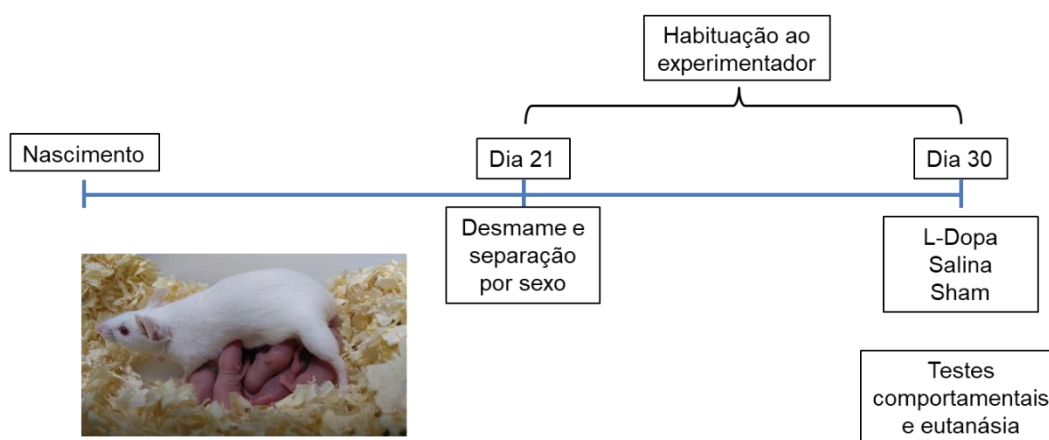
### 3.3 MÉTODOS

#### 3.3.1. Animais e procedimento experimental

Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas primíparas, com idades de 8 a 12 semanas fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Protocolo CEUA n° 39/2015). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com maravalha em ambiente climatizado ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade 40-70%), com água e ração *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, sendo os machos alocados separadamente das fêmeas. No período de cruzamento machos e fêmeas eram alocados na mesma caixa, na proporção 1:2 por 5 dias. Para os experimentos as ninhadas tiveram seu tamanho padronizado em 9 filhotes, visando controlar os efeitos da variação do cuidado materno.

Aos 21 dias os animais eram desmamados e separados por sexo, passando a ter contato com o experimentador por alguns minutos em dias alternados, até a execução dos testes comportamentais. O contato consistia no manuseio do animal em sua própria caixa, de modo semelhante ao que ocorreria durante a execução dos testes comportamentais, e visava a habituação do animal ao experimentador.

Ao completarem 4 semanas (28 a 32 dias de vida) os animais recebiam a injeção dos agonistas dopaminérgicos ou solução salina e eram submetidos aos testes comportamentais, sendo então eutanasiados e os cérebros processados e guardados para análises posteriores. No dia dos testes comportamentais os animais eram pesados, numerados aleatoriamente e habituados à sala de comportamento por cerca de uma hora antes dos experimentos.



**Figura 21:** Esquema do procedimento experimental

Neste protocolo os animais foram submetidos a injeções intraperitoneais de salina, L-Dopa + benserazida (10/5 e 50/25 mg/kg; Sigma Aldrich D1507 e B7283 respectivamente), quinpirole (0,5 mg/kg Sigma Aldrich Q111) ou SKF 38393 (5 mg/kg Sigma Aldrich D047); todos em volume de 350µl a cada 30 gramas de peso do animal, e tiveram o comportamento avaliado após trinta ou cinquenta minutos (BENINGER; RANALDI, 1992; JUNG; SHIM, 2011; LUQUE-ROJAS *et al.*, 2013). Um resumo do desenho experimental pode ser visto na Figura 21.

### **3.3.2. Testes comportamentais**

#### *3.3.2.a. Teste do labirinto em cruz elevado*

Trinta minutos após receberem a injeção por via intraperitoneal contendo L-Dopa+benserazida (10/5 ou 50/25 mg/kg), quinpirole (0,5mg/kg), SKF 38393 (5mg/kg) ou salina (grupo controle) os animais foram colocados no labirinto e tiveram o comportamento filmado por cinco minutos. O aparato utilizado, os parâmetros avaliados no teste e a metodologia de análise foram os mesmos já citados no item 2.3.2.a.

#### *3.3.2.b. Teste da caixa de atividades*

Para este teste foram utilizados os mesmos animais que passaram pelo labirinto em cruz elevado, devido à sua curta duração. O teste da caixa de atividades foi iniciado imediatamente após o teste do labirinto em cruz elevado, ou seja, trinta e cinco minutos após os animais receberem a injeção. A metodologia e os parâmetros avaliados foram os mesmos já citados no item 2.3.2.b.

#### *3.3.2.c. Teste do nado forçado*

Para este teste foi utilizado um grupo de animais diferente daquele que passou pelos testes do labirinto em cruz elevado e da caixa de atividades. Acreditamos que não seria adequado expor um mesmo animal a três novos contextos com níveis altos de estresse, sob o risco de agregar um viés aos resultados.

Cinquenta minutos após receberem a injeção por via intraperitoneal contendo L-Dopa + benserazida, quinpirole, SKF ou salina (grupo controle) os animais foram colocados no béquer

com água e tiveram o comportamento filmado por seis minutos. O aparato e os parâmetros avaliados foram os mesmo já citados no item 2.3.2.c.

### **3.3.3. Análise estatística**

As análises estatísticas dos dados obtidos, bem como a confecção dos gráficos foram realizadas com auxílio dos softwares SigmaPlot 11.0 e GraphPad Prism 6. Para os testes comportamentais foram utilizadas One Way ANOVA para os dados paramétricos e One Way ANOVA On Ranks para os dados não paramétricos, seguidas dos testes de Tukey ou Dunn. Foi adotado nível de significância de  $p < 0,05$ .

Os gráficos em boxplot apresentam a média/mediana e os valores mínimo e máximo. O número amostral de cada grupo é demonstrado na parte inferior dos gráficos. Diferenças significativas são representadas pelos símbolos \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) ou \*\*\* ( $p < 0,001$ ). A linha pontilhada representa a média do grupo naive, mas os dados deste grupo não foram incluídos nas análises estatísticas.

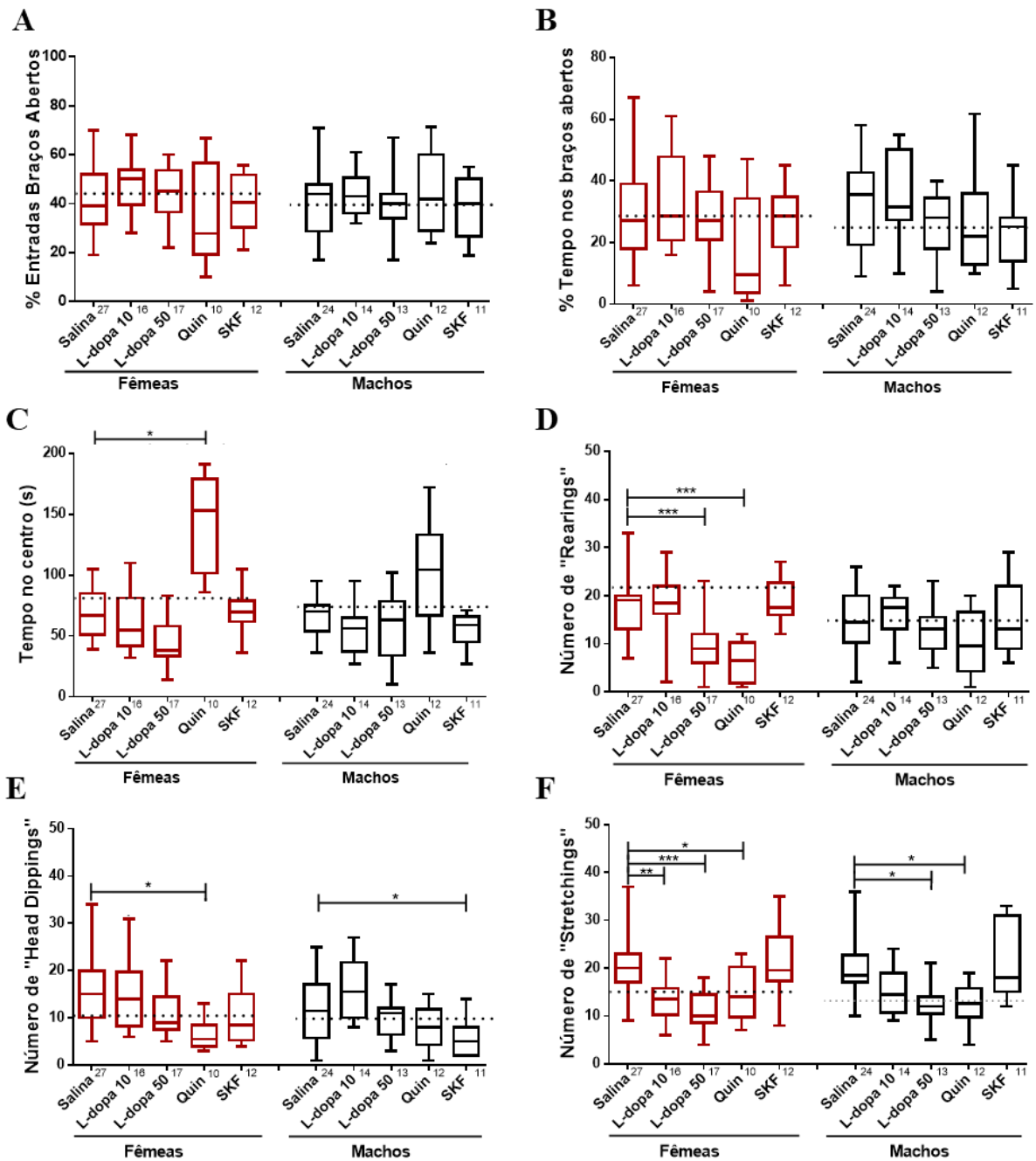
## **3.4 RESULTADOS**

### **3.4.1. Testes comportamentais**

#### *3.4.1.a. Teste do labirinto em cruz elevado: o aumento do tônus dopaminérgico em camundongos pré-púberes altera o comportamento de análise de risco*

A avaliação da porcentagem de entradas nos braços abertos não mostrou diferenças significativas para machos ou fêmeas ( $F=1,642$   $P=0,172$  One Way ANOVA para fêmeas e  $F=0,511$   $P=0,728$  One Way ANOVA para machos). O mesmo ocorreu para a porcentagem de tempo nos braços abertos do aparato ( $H=6,729$   $P=0,151$  One Way ANOVA on Ranks para fêmeas e  $F=2,097$   $P=0,090$  One Way ANOVA para machos) (Figura 22A e B).

A análise do tempo de permanência dos animais no quadrado central do labirinto revelou que, para as fêmeas, a administração de quinpirole levou a um aumento significativo neste parâmetro ( $H=33,609$   $P < 0,05$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn). Para os machos foi detectada apenas diferença entre os grupos quinpirole versus SKF e L-Dopa 10 ( $H=16,630$   $P < 0,05$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn) (Figura 22C).



**Figura 22:** Efeitos do aumento agudo do tônus dopaminérgico em camundongos machos e fêmeas pré-púberes no teste do labirinto em cruz elevado. (A) Porcentagem de entradas no braço aberto; (B) Porcentagem de tempo nos braços abertos; (C) Tempo no centro do aparato, em segundos; (D) Número de rearings; (E) Número de Head dippings; (F) Número de Stretchings. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ .

No parâmetro “Número de rearings”, foi demonstrado que a administração de L-Dopa 50mg/Kg e quinpirole levaram a uma redução significativa da expressão deste comportamento para as fêmeas ( $F=13,654$   $P < 0,001$  One Way ANOVA/Tukey). Para os machos não foi

demonstrada nenhuma diferença significativa entre os grupos ( $F=2,196$   $P=0,078$  One Way ANOVA) (Figura 22D).

Quanto ao “Número de head dippings”, a análise dos resultados mostrou que a administração de quinpirole leva à redução significativa da expressão deste comportamento para as fêmeas ( $H=19,759$   $P<0,05$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn). Camundongos machos também apresentaram redução do número de head dippings, porém, causado pela administração de SKF 38393 ( $F=5,879$   $P=0,044$  One Way ANOVA/Tukey) (Figura 22E).

Com relação ao “Número de stretchings”, para as fêmeas este comportamento teve redução significativa em função da administração de L-Dopa 10mg/kg; L-Dopa 50mg/kg e quinpirole ( $F=9,637$   $P=0,003$ ;  $P<0,001$  e  $P=0,046$  respectivamente; One Way ANOVA/Tukey). Para os machos, a redução do número de stretchings ocorreu pela administração de L-Dopa 50mg/kg e quinpirole apenas ( $H=23,857$   $P<0,05$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn) (Figura 22F).

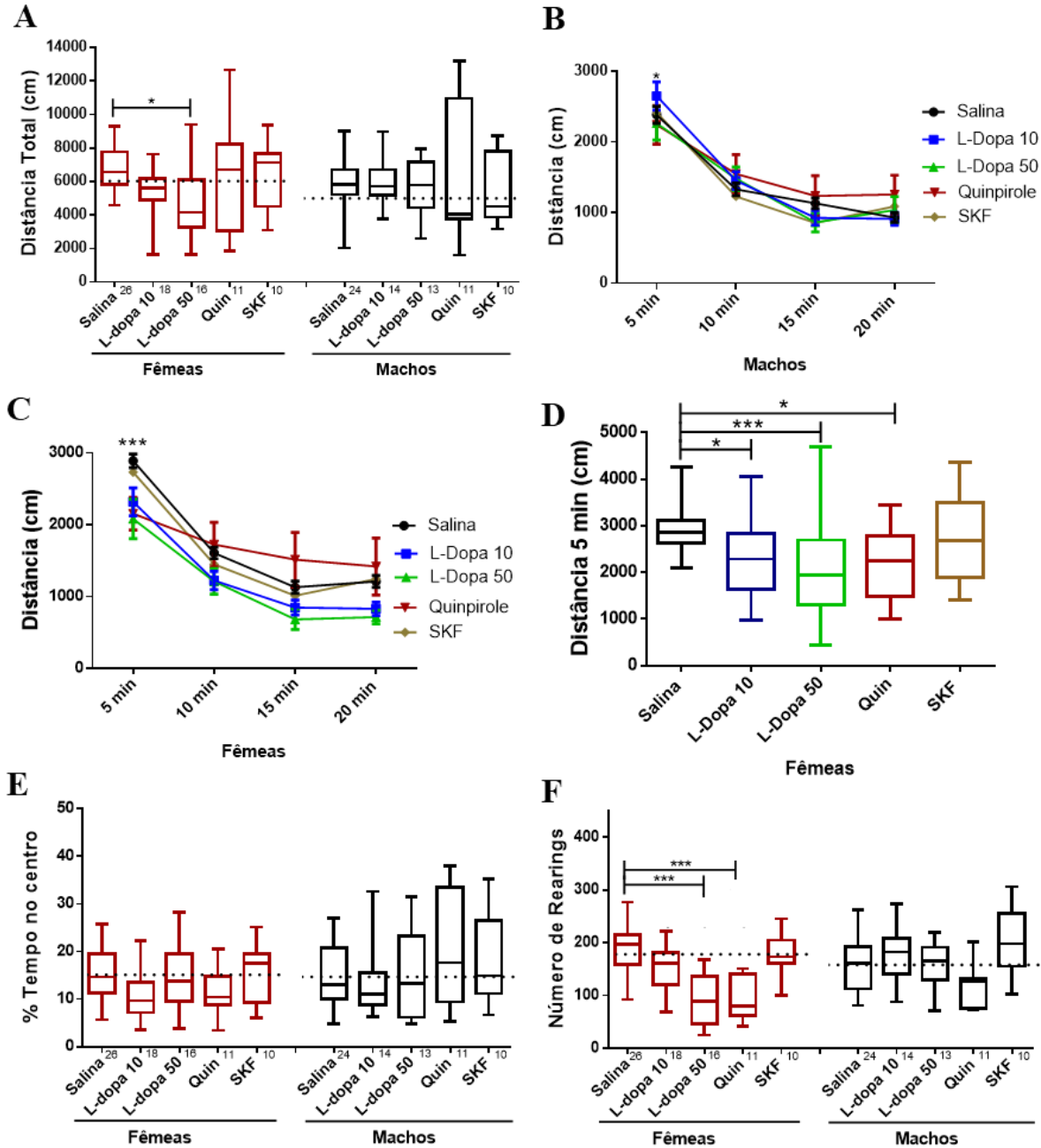
#### *3.4.1.b. Teste da caixa de atividades: o aumento agudo do tônus dopaminérgico aos 30 dias altera o comportamento locomotor e exploratório apenas das fêmeas*

O teste da caixa de atividades foi novamente utilizado para mensurar a atividade locomotora dos animais após administração aguda de agonistas dopaminérgicos e ainda como indicativo da manifestação de fenótipo tipo ansioso pela quantificação da exploração vertical (rearings) e tempo de permanência na região central do aparato.

A avaliação da distância total percorrida durante os vinte minutos de teste revelou que as fêmeas que receberam injeção de L-Dopa 50mg/kg se locomoveram menos em relação ao grupo controle ( $H=13,332$   $P<0,05$  One Way ANOVA on Ranks/Dunn). Para os machos não foram identificadas diferenças significativas ( $H=0,489$   $P=0,975$  One Way ANOVA on Ranks) (Figura 23A).

Para verificar se algum dos agonistas dopaminérgicos foi capaz de induzir alterações comportamentais mais sutis no teste da caixa de atividades e para melhor avaliar o efeito observado na análise anterior, dividimos o período total em quatro intervalos de cinco minutos. Para os machos, novamente não foi identificada nenhuma alteração (Two Way ANOVA) (Figura 23B). No grupo das fêmeas foram detectadas diferenças significativas apenas nos primeiros cinco minutos de teste, nos quais a administração de L-Dopa 10 e 50 mg/kg e de

quinpirole levou a menor atividade locomotora (Two Way ANOVA/Dunnet  $P < 0,05$  ou  $P < 0,001$ ) (Figura 23C e D).



**Figura 23:** Efeitos da administração aguda de agonistas dopaminérgicos em camundongos machos e fêmeas pré-púberes no teste da caixa de atividades. (A) Distância total percorrida, em centímetros; (B) Distância total percorrida, em centímetros a cada 5 minutos de teste para machos; (C) Distância total percorrida, em centímetros a cada 5 minutos de teste para fêmeas; (D) Destaque da distância percorrida pelas fêmeas nos primeiros 5 minutos de teste; (E) Porcentagem de tempo passado no centro da arena; (F) Número de rearings. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Com relação à porcentagem de tempo de permanência no centro da caixa durante o teste não foram identificadas diferenças entre os grupos para machos ou para fêmeas ( $F=2,662$   $P=0,228$  One Way ANOVA para fêmeas e  $H=2,546$   $P=0,636$  One Way ANOVA on Ranks para machos) (Figura 23E).

Quanto à exploração vertical do ambiente, foi demonstrado que as fêmeas que receberam L-Dopa 50mg/kg ou quinpirole exibiram menor frequência de rearings em relação ao grupo controle ( $F=16,041$   $P<0,001$  One Way ANOVA/Tukey). Para os machos foi detectada apenas diferença entre os grupos que receberam quinpirole e SKF ( $F=3,520$   $P=0,005$  One Way ANOVA/Tukey) (Figura 23F).

#### *3.4.1.c. Teste do nado forçado: o aumento agudo do tônus dopaminérgico aos 30 dias altera o comportamento tipo depressivo de camundongos machos e fêmeas*

A avaliação da latência para o primeiro episódio de imobilidade não mostrou diferenças significativas para as fêmeas ( $H=8,162$   $P=0,086$  One Way ANOVA on Ranks). Entre os machos, foi demonstrado que a administração aguda de L-Dopa nas doses de 10 e 50 mg/kg foi capaz de reduzir o tempo de latência ( $H=13,760$   $P<0,05$ , One Way ANOVA on Ranks/Dunn) (Figura 24A).

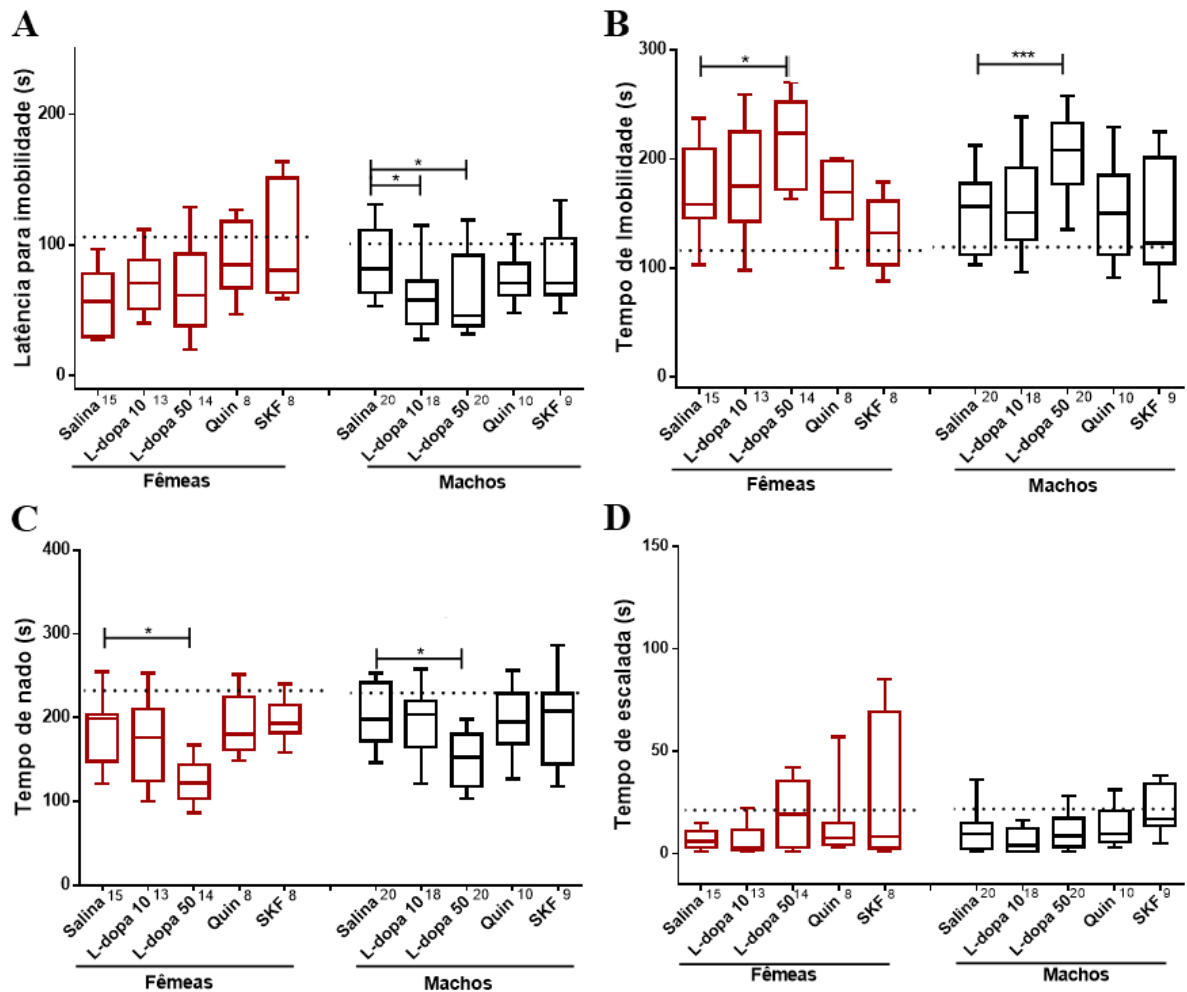
Com relação ao tempo total de imobilidade, tanto para as fêmeas quanto para os machos a injeção de L-Dopa 50mg/kg causou aumento significativo deste parâmetro ( $F=5,571$   $P<0,05$ , One Way ANOVA/SNK para fêmeas e  $F=6,621$   $P<0,05$ , One Way ANOVA/Tukey para machos) (Figura 24B).

A análise do tempo total de nado teve resultado similar: novamente animais que receberam L-Dopa 50mg/kg, machos e fêmeas, apresentaram menor tempo total de nado ( $H=20,731$   $P<0,05$ , One Way ANOVA on Ranks/Dunn para fêmeas e  $F=6,509$   $P<0,05$ , One Way ANOVA/Tukey para os machos) (Figura 24C).

Com relação ao tempo de escalada, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de fêmeas ( $H=5,279$   $P=0,260$  One Way ANOVA on Ranks). Entre os machos foi detectada apenas diferença entre os grupos L-Dopa 10mg/kg e SKF ( $H=14,387$   $P<0,05$ , One Way ANOVA on Ranks/Dunn) (Figura 24D).

No parâmetro frequência de imobilidade foi verificado que a administração aguda de L-Dopa 50mg/kg foi capaz de reduzir o número de episódios de imobilidade para fêmeas e machos ( $F=3,520$   $P<0,05$ , One Way ANOVA/Tukey para fêmeas e  $H=16,105$   $P<0,05$ , One Way ANOVA on Ranks/Dunn para machos) (Figura 25A). E quando aplicamos a razão entre os

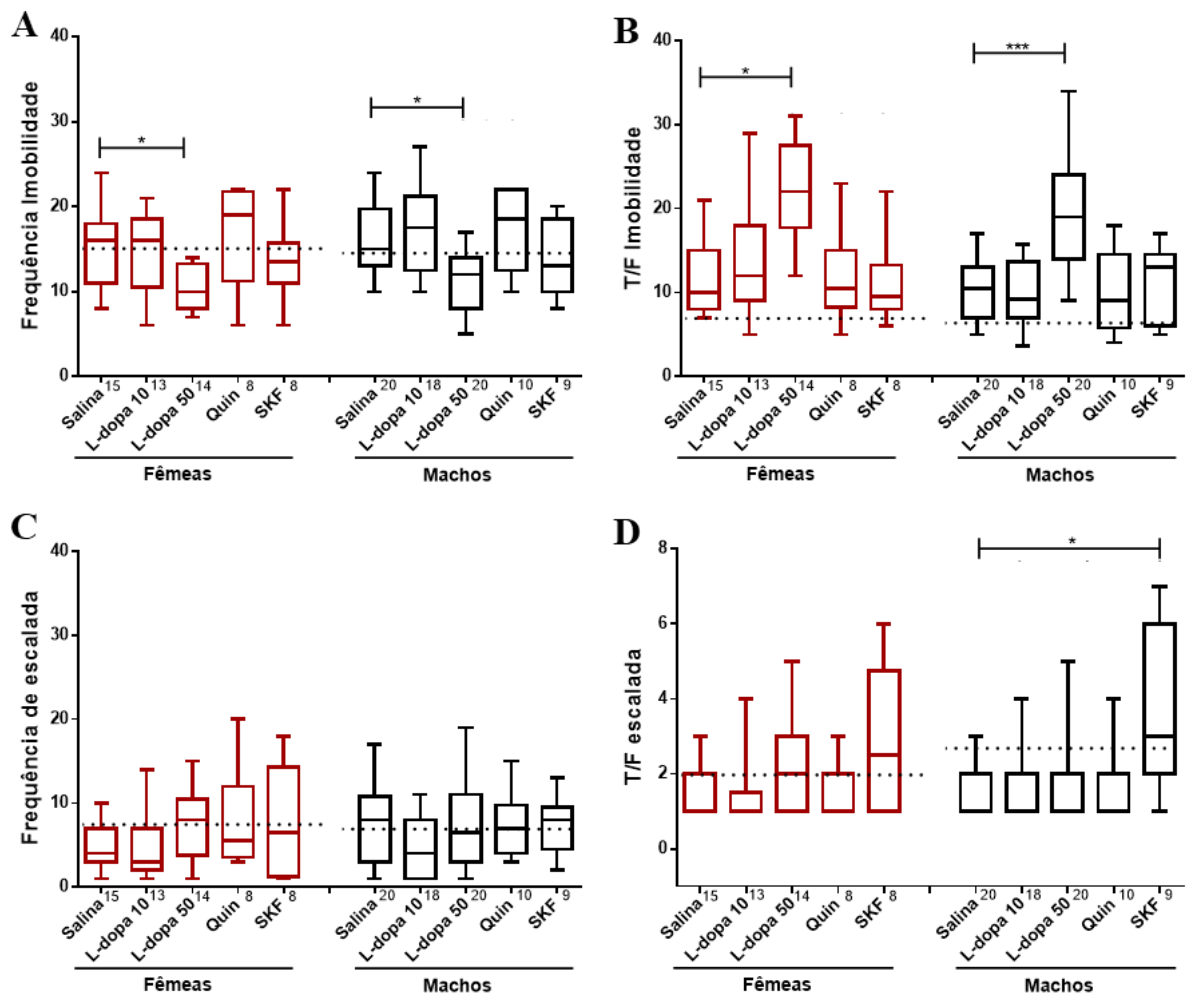
valores de tempo e frequência de imobilidade, foi verificado que animais que receberam L-Dopa 50mg/kg apresentaram maiores valores, para ambos os sexos ( $H=20,024$   $P<0,05$ , One Way ANOVA on Ranks/Dunn para fêmeas e  $F=12,502$   $P<0,05$ , One Way ANOVA/Tukey para machos) (Figura 25B).



**Figura 24:** Efeitos da administração aguda de agonistas dopaminérgicos no teste do nado forçado em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. (A) Latência para primeiro episódio de imobilidade, em segundos; (B) Tempo total de imobilidade durante o teste, em segundos (C) Tempo total de nado durante o teste, em segundos; (D) Tempo total de escalada durante o teste, em segundos. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \* $P<0,05$  \*\* $P<0,01$  \*\*\*  $P<0,001$ .

Quanto à frequência do comportamento de escalada, não foram detectadas diferenças significativas para fêmeas ou machos ( $H=4,097$  One Way ANOVA on Ranks para fêmeas e  $H=5,427$  One Way ANOVA on Ranks para machos) (Figura 25C). E a razão entre o tempo e a frequência de escalada não mostrou diferenças entre as fêmeas ( $H=7,963$  One Way ANOVA on Ranks), enquanto para os machos a administração de SKF 38393 foi capaz de elevar este valor ( $H=15,737$   $P<0,05$ , One Way ANOVA on Ranks/Dunn) (Figura 25D).





**Figura 25:** Efeitos da administração aguda de agonistas dopaminérgicos no teste do nado forçado em camundongos machos e fêmeas pré-púberes. (A) Frequência de episódios de imobilidade; (B) Razão Tempo/Frequência de imobilidade; (C) Frequência de episódios de comportamento de escalada; (D) Razão Tempo/Frequência de escalada. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$ .

### 3.5 DISCUSSÃO

Enquanto o estresse agudo induz um enfraquecimento fisiológico transitório das conexões da rede do córtex pré-frontal, a exposição ao estresse crônico induz adicionalmente mudanças na arquitetura das células piramidais desta região. O estresse crônico causa retração dendrítica e perda de espinhas, e essas mudanças estruturais estão associadas à déficits na função do CPF. Em indivíduos normais, essas mudanças arquitetônicas são revertidas quando o estressor é removido. Entretanto, insultos ambientais e genéticos podem reduzir a resiliência à exposição ao estresse. (ARNSTEN, 2011; MCEWEN; NASCA; GRAY, 2016).

A exposição a agentes estressores de modo transitório provoca aumento na liberação de DA nas vias mesolímbica e mesocortical. Estudos mostram níveis elevados de DA no estriado, núcleo acumbens e no córtex pré-frontal de roedores em resposta ao estresse agudo (PRUESSNER, 2004; RASHEED *et al.*, 2010; BELUJON; GRACE, 2015). Além disso, a administração aguda de glicocorticoides, produto final da ativação do eixo HPA, foi capaz de aumentar a atividade dos neurônios dopaminérgicos (PIAZZA *et al.*, 1996).

Já foi demonstrado que o aumento do efluxo de DA é acionado pela ativação de receptores NMDA no hipocampo ventral, que é estimulado diretamente pelo córtex pré-frontal, levando a ativação dos neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral (BUTTS *et al.*, 2011). O hipocampo ventral é a principal área associada com a regulação negativa do eixo HPA. Além disso, o hipocampo ventral não está somente associado à resposta ao estresse, mas pode também regular comportamentos afetivos e, portanto, representa um local de convergência dos efeitos do estresse com a manifestação de sintomas associados às doenças neuropsiquiátricas (LODGE; GRACE, 2011a).

Neste delineamento experimental os animais foram submetidos a um aumento agudo do tônus dopaminérgico e avaliados em testes comportamentais que mensuram reações naturais frente a um ambiente desconhecido e potencialmente ansiogênico. Basicamente, os efeitos de uma situação de estresse agudo foram mimetizados antes da exposição dos animais aos testes comportamentais. Essa abordagem foi proposta para verificar as consequências comportamentais de uma sobrecarga no sistema dopaminérgico na pré-puberdade, dando continuidade à avaliação das funções da sinalização dopaminérgica durante o desenvolvimento.

No teste do labirinto em cruz elevado foi possível perceber maior susceptibilidade das fêmeas às alterações comportamentais causadas pela administração dos agonistas dopaminérgicos em relação aos machos; situação oposta àquela verificada quando as substâncias foram administradas no período pós-natal. Neste ponto é válido ressaltar que, no período de realização dos testes as fêmeas não tinham entrado na puberdade, o que foi constatado pela verificação da abertura genital durante a pesagem no dia dos testes.

Novamente não foram vistas alterações nos parâmetros clássicos do teste, porcentagem de entradas e porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do labirinto. Entretanto, todos os outros parâmetros foram fortemente influenciados pelo protocolo. A administração de L-Dopa e quinpirole trinta minutos antes do teste foi capaz de aumentar o tempo de permanência no centro do aparato e reduzir os comportamentos de exploração vertical e avaliação de risco - rearings, head dippings e stretchings para as fêmeas, o que denota efeito

predominantemente ansiolítico. Para os machos houve redução no número de head dippings com a administração de SKF e redução do total de stretchings em consequência da injeção de L-Dopa 50 mg/kg e quinpirole. Enquanto para as fêmeas pré-púberes a ativação do receptor D2 parece ter maior relevância para o comportamento tipo ansioso, para os machos não foi demonstrada uma definição evidente. Um mesmo comportamento – frequência de head dippings – foi reduzido nas fêmeas pelo agonista D2 e nos machos pelo agonista D1. Esse é um achado interessante principalmente pelo fato de que os receptores D2/D3 são mediadores críticos nas respostas iniciais às drogas de abuso (MADRAS, 2014).

No teste da caixa de atividades novamente os machos se mostraram mais resilientes, e nenhum dos parâmetros avaliados sofreu alteração em função da aplicação do protocolo experimental. Para as fêmeas, em contrapartida, houve redução da distância total percorrida como resultado da administração de L-Dopa 50mg/kg. Ao fracionar o teste em quatro períodos de cinco minutos, foi observada redução da distância percorrida no primeiro intervalo para as fêmeas que receberam L-Dopa 10 ou 50 mg/kg e quinpirole, demonstrando que estes animais tiveram maior dificuldade na adaptação ao ambiente desconhecido. E com relação ao número de rearings, as fêmeas que receberam L-Dopa 50 mg/kg e quinpirole tiveram menor expressão deste comportamento. Analisados em conjunto, esses dados permitem inferir que o desafio com L-Dopa na dose de 50 mg/kg e quinpirole foi capaz de alterar o comportamento locomotor e/ou exploratório das fêmeas no teste da caixa de atividades.

O estriado, que tem relação direta com o controle motor, é composto por neurônios GABAérgicos que contêm receptores DA que se dividem em dois ramos principais - a via direta que expressa D1 e a via indireta que expressa D2. Jung e Shim (2011) administraram SKF 38393 e quinpirole a camundongos C57BL/6J machos adultos e verificaram a atividade locomotora e os níveis de GABA. Ambos aumentaram a atividade locomotora (distância percorrida) de forma dose dependente, mas o nível de GABA no estriado foi aumentado por SKF e reduzido por quinpirole. Estes resultados mostram que as contribuições das vias direta e indireta são seletivas para comportamentos motores GABAérgicos estriatais.

Mesmo com dosagens semelhantes às do estudo citado acima os agonistas dopaminérgicos não aumentaram a atividade locomotora dos machos em nosso experimento. Algumas justificativas possíveis são a diferença no tempo total do teste e a idade dos animais. No trabalho de Jung e Shim (2011) a atividade locomotora é avaliada durante 60 minutos, sendo que SKF induz redução da distância percorrida nos primeiros vinte minutos (tendência) e quinpirole (na dose mais próxima à que adotamos) não causa alterações neste mesmo período.

Além disso os animais são adultos e de linhagem diferente. Como já mencionado anteriormente, a pré-puberdade é uma janela desenvolvimental carente de estudos farmacológicos.

Os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral no circuito de recompensa do cérebro têm um papel crucial na mediação das respostas ao estresse, incluindo a determinação da suscetibilidade versus resiliência induzidas pela exposição a agentes estressores (TRAINOR, 2011; YORGASON *et al.*, 2013; CHAUDHURY *et al.*, 2013b). No contexto dos fenótipos depressivos, a motivação é avaliada apresentando roedores a um estressor inevitável, como no teste de suspensão da cauda ou no teste de natação forçada, e quantificando a proporção de tempo gasto realizando comportamentos ativos em relação ao tempo gasto imóvel, que tem sido interpretado como um sinal de desespero comportamental ou passividade (TYE *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos no teste do nado forçado evidenciam a manifestação de comportamento tipo depressivo para machos e fêmeas que receberam administração de L-Dopa cinquenta minutos antes do início do teste. Foram observadas reduções no tempo de nado e na frequência de imobilidade, e aumentos no tempo de imobilidade e na razão tempo/frequência de imobilidade. Isso significa que, embora tenham exibido menos episódios de imobilidade, a duração de cada episódio foi maior. E para os machos L-Dopa ainda foi capaz de reduzir a latência para o primeiro episódio de imobilidade, corroborando o fenótipo tipo depressivo. A administração dos agonistas específicos D1 ou D2 não foi capaz de alterar o comportamento dos animais nesse teste, sugerindo que a ativação de ambos os receptores é necessária para a manifestação do fenótipo tipo depressivo na pré-puberdade.

Com exceção do teste do nado forçado, foi observada resposta sexualmente dimórfica na avaliação de comportamentos associados à ansiedade, com maior susceptibilidade das fêmeas às intervenções farmacológicas. O dimorfismo sexual do sistema dopaminérgico em roedores adultos é bem conhecido. A liberação e captação de DA são maiores no estriado de ratas adultas do que nos machos, e o tônus dopaminérgico basal é cronicamente mais elevado no estriado de machos adultos do que em fêmeas (WALKER *et al.*, 2000; BECKER, 2009). Também há diferenças no número de células dopaminérgicas e projeções na via mesocortical entre machos e fêmeas adultos (KRITZER; CREUTZ, 2008). Essas diferenças derivam do dimorfismo já descrito no período perinatal, influenciado pelo perfil hormonal típico de cada sexo. Nossos resultados confirmam que as respostas comportamentais sexualmente dimórficas já descritas na idade adulta também estão presentes na pré-puberdade, mas são necessários mais estudos para compreender os mecanismos que sustentam o dimorfismo nesta janela do desenvolvimento. A Figura 26 apresenta um resumo dos resultados observados neste delineamento experimental.

|     |   | D10        | D50         | SKF         | Quin        |
|-----|---|------------|-------------|-------------|-------------|
| LCE | ♀ | -          | ansiolítico | -           | ansiolítico |
|     | ♂ | -          | ansiolítico | ansiolítico | ansiolítico |
| CA  | ♀ | ↓Locom. 5' | ↓Locom.     | -           | ↓Locom. 5'  |
|     | ♂ | -          | -           | -           |             |
| NF  | ♀ | -          | depressivo  | -           | -           |
|     | ♂ | depressivo | depressivo  | -           | -           |

**Figura 26:** Resumo dos resultados obtidos nos testes comportamentais. D10: 1-dopa 10 mg/kg. D50: 1-dopa 50 mg/kg. LCE: teste do labirinto em cruz elevado. CA: teste da caixa de atividades. NF: teste do nado forçado.

## **4. EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO DESAFIO DOPAMINÉRGICO EM CAMUNDONGOS PRÉ-PÚBERES PREVIAMENTE EXPOSTOS AO DISTÚRBIO NA SINALIZAÇÃO DOPAMINÉRGICA NO PERÍODO PÓS-NATAL**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

O sistema dopaminérgico tem sido alvo de testes de desafio com psicofármacos a fim de descobrir anormalidades na sensibilidade dos receptores ou liberação de DA em certas condições neuropsiquiátricas e em indivíduos saudáveis, mas que diferem em relação à escores baixos nas dimensões de personalidade relacionadas a determinadas síndromes psicopatológicas, como a impulsividade ou a depressão (NETTER, 2006).

Diversas enfermidades neuropsiquiátricas partilham componentes etiológicos associados ao desenvolvimento e a alterações na sinalização dopaminérgica. Isso significa que mesmo antes da manifestação dos primeiros sintomas, o tecido neural já possui variações que, na presença de um gatilho, levarão à emergência das manifestações patológicas.

Pacientes com esquizofrenia, por exemplo, apresentam maior sensibilidade a drogas semelhantes à DA, como anfetaminas ou metilfenidato, respondendo a essas drogas com sintomas psicóticos aumentados, em comparação aos controles. Possíveis causas dessa supersensibilidade podem ser uma elevação pós-sináptica na quantidade dos receptores D2 ou uma alteração na sensibilidade dos receptores (SEEMAN; KAPUR, 2000; SEEMAN, 2013; KAHN *et al.*, 2015).

A estimulação repetida com agonistas dopaminérgicos produz um aumento progressivo da sensibilidade dos receptores de DA. A facilitação da responsividade tem sido demonstrada a nível eletrofisiológico e comportamental. Este aumento progressivo na sensibilidade do receptor D1 que foi denominado "priming", exibe várias propriedades importantes. O priming do receptor D1 pode ser homólogo (um agonista D1 é usado como primer) ou heterólogo (agonistas D1/D2 ou D2 seletivos como primers) (CRISWELL; MUELLER; BREESE, 1989; MORELLI *et al.*, 1989; SIMOLA *et al.*, 2009; DRAKE *et al.*, 2013).

Para testar a sensibilização dos receptores o intervalo entre o estímulo de priming e o desafio com o agonista varia de um a pelo menos 14 dias segundo dados da literatura, sendo que as menores doses do priming requerem um aumento no número de administrações. Uma vez que a resposta máxima foi atingida, ela se mantém por pelo menos seis meses em animais adultos. Assim, o processo de priming parece produzir uma mudança relativamente permanente na capacidade de resposta do receptor D1 (PAUL; CURRIE; ROBERTSON, 1995).

Em contraste com os adultos, ratos pré-desmame exibem sensibilização comportamental por poucos dias após a cessação do tratamento com agonista dopaminérgico. Nos animais adultos, mudanças maturacionais no receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) parecem ser responsáveis pela maior duração da sensibilização, uma vez que a estimulação desses receptores é necessária para o desenvolvimento do priming induzido por agonistas DA. Nos ratos em fase de pré-desmame, entretanto, estas diferenças maturacionais não são primariamente responsáveis pela falta de sensibilização de longo prazo (DUKE; O'NEAL; MCDUGALL, 1997).

Neste delineamento experimental os animais que receberam injeções intraperitoneais de l-dopa 50mg/kg nos cinco primeiros dias de vida foram ressubmetidos a um desafio com nova injeção de l-dopa aos 30 dias de idade, antes de terem o comportamento avaliado quanto à manifestação de fenótipos tipo ansioso e tipo depressivo. A proposta foi verificar se a administração de l-dopa nos cinco primeiros dias de vida seria capaz de potencializar ou reduzir as manifestações comportamentais causadas pelo desafio dopaminérgico na pré-adolescência o que, a nível molecular, significa testar se as adaptações induzidas pelo aumento do tônus dopaminérgico nos cinco primeiros dias de vida são capazes de potencializar as respostas ao fornecermos ao sistema nova sobrecarga de dopamina.

## 4.2 OBJETIVOS

Este procedimento experimental teve como objetivos específicos:

- Verificar os efeitos da administração aguda de L-Dopa na atividade locomotora de camundongos machos e fêmeas pré-púberes que passaram por aumento do tônus dopaminérgico nos cinco primeiros dias de vida, utilizando o teste da caixa de atividades.
- Avaliar se a administração aguda de L-Dopa aos 30 dias de vida altera o comportamento tipo ansioso de camundongos machos e fêmeas que passaram por aumento do tônus dopaminérgico nos cinco primeiros dias de vida, utilizando o teste do labirinto em cruz elevado.
- Analisar os efeitos da administração aguda de L-Dopa em camundongos machos e fêmeas pré-púberes que passaram por aumento do tônus dopaminérgico nos cinco primeiros dias de vida quanto ao comportamento tipo depressivo, utilizando o teste do nado forçado.

## 4.3 MÉTODOS

### 4.3.1. Animais e procedimento experimental

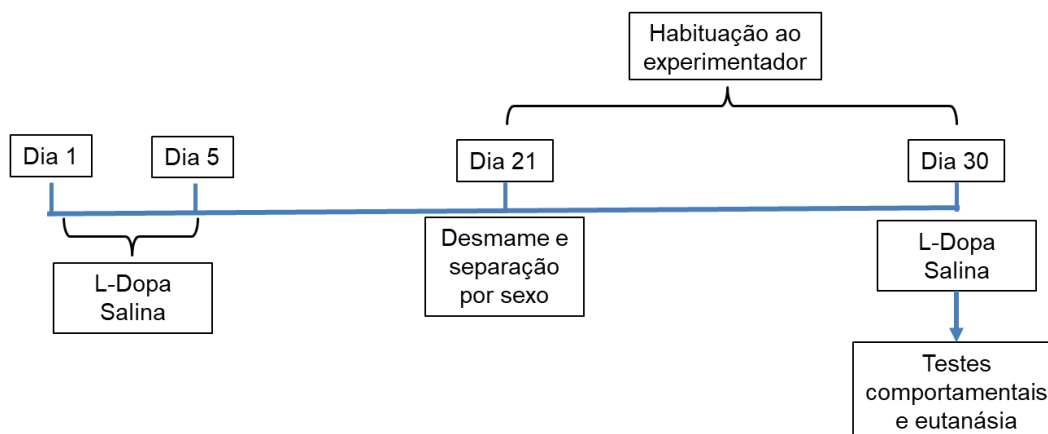
Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas primíparas, com idades de 8 a 12 semanas fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Protocolo CEUA n° 39/2015). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com maravalha em ambiente climatizado ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade 40-70%), com água e ração *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, sendo os machos alocados separadamente das fêmeas. No período de cruzamento machos e fêmeas eram alocados na mesma caixa, na proporção 1:2 por 5 dias. Para os experimentos as ninhadas tiveram seu tamanho padronizado em 9 filhotes, visando controlar os efeitos da variação do cuidado materno.

Após o nascimento os filhotes eram pesados e designados aleatoriamente para os grupos “controle” ou “tratado”. A marcação dos neonatos consistia no corte da falange distal do dedo mais externo das patas dianteiras, como mostra a Figura 8. Durante os cinco primeiros dias de vida os filhotes eram pesados e recebiam por via intraperitoneal L-Dopa + benserazida (Sigma Aldrich D1507 e B7283 respectivamente) nas doses de 50/25 mg/kg diluídos em solução salina 0,9% em volume de 10  $\mu\text{L}$  a cada 1,5g de peso do animal. O grupo controle recebia salina na mesma proporção volume/peso.

Aos 21 dias os animais eram desmamados e separados por sexo, passando a ter contato com o experimentador por alguns minutos em dias alternados, até a execução dos testes comportamentais. O contato consistia no manuseio do animal em sua própria caixa, de modo semelhante ao que ocorreria durante a execução dos testes comportamentais, e visava a habituação do animal ao experimentador.

Ao completarem 4 semanas (28 a 32 dias de vida) os animais recebiam novamente injeção de L-Dopa 50 mg/kg ou solução salina e eram submetidos aos testes comportamentais, sendo então eutanasiados e os cérebros processados e guardados para análises posteriores. No dia dos testes comportamentais os animais eram pesados, numerados aleatoriamente e habituados à sala de comportamento por cerca de uma hora antes dos experimentos. Um resumo do desenho experimental pode ser visto na **Figura 27**.





**Figura 27:** Esquema do procedimento experimental

### 4.3.2. Testes comportamentais

#### 4.3.2.a. Teste do labirinto em cruz elevado

Trinta minutos após receberem a injeção por via intraperitoneal contendo L-Dopa + benserazida (50/25 mg/kg) ou salina (grupo controle) os animais foram colocados no labirinto e tiveram o comportamento filmado por cinco minutos. O aparato utilizado, os parâmetros avaliados no teste e a metodologia de análise foram os mesmos já citados no item 2.3.2.a.

#### 4.3.2.b. Teste da caixa de atividades

Para este teste foram utilizados os mesmos animais que passaram pelo labirinto em cruz elevado, devido à sua curta duração. O teste da caixa de atividades foi iniciado imediatamente após o teste do labirinto em cruz elevado, ou seja, trinta e cinco minutos após os animais receberem a injeção. A metodologia e os parâmetros avaliados foram os mesmos já citados no item 2.3.2.b.

#### 4.3.2.c. Teste do nado forçado

Para este teste foi utilizado um grupo de animais diferente daquele que passou pelos testes do labirinto em cruz elevado e da caixa de atividades. Novamente achamos que não seria adequado expor um mesmo animal a três novos contextos com níveis altos de estresse, sob o risco de agregar um viés aos resultados.

Cinquenta minutos após receberem a injeção por via intraperitoneal contendo L-Dopa + benserazida ou salina (grupo controle) os animais foram colocados no béquer com água e tiveram o comportamento filmado por seis minutos. O aparato e os parâmetros avaliados foram os mesmos já citados no item 2.3.2.c.

### **4.3.3. Análise estatística**

As análises estatísticas dos dados obtidos, bem como a confecção dos gráficos foram realizadas com auxílio dos softwares SigmaPlot 11.0 e GraphPad Prism 6. Para os testes comportamentais foi utilizada Two Way ANOVA e teste de Tukey. Foi adotado nível de significância de  $p < 0,05$ .

Os gráficos em boxplot apresentam a média/mediana e os valores mínimo e máximo. O número amostral de cada grupo é demonstrado na parte inferior dos gráficos. No eixo X a primeira letra corresponde ao que foi administrado ao animal no período pós natal e a segunda aos 30 dias de vida, sendo S=salina e D=l-dopa. Diferenças significativas são representadas pelos símbolos \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) ou \*\*\* ( $p < 0,001$ ). A linha pontilhada representa a média do grupo naive, mas os dados deste grupo não foram incluídos nas análises estatísticas.

## **4.4 RESULTADOS**

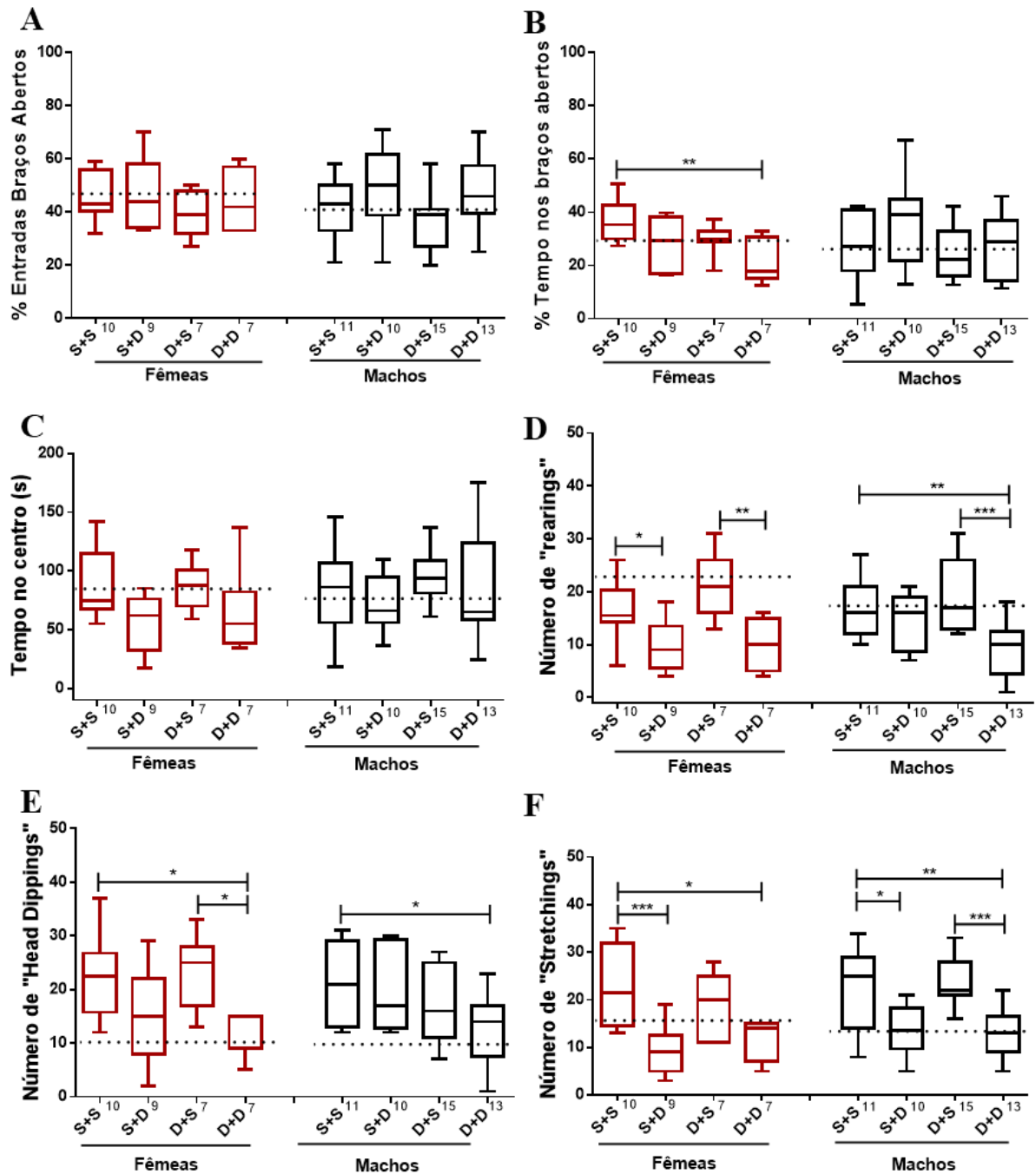
### **4.4.1. Testes comportamentais**

#### *4.4.1.a. Teste do labirinto em cruz elevado:*

No parâmetro “porcentagem de entradas nos braços abertos” não houve diferenças significativas entre os grupos, para interação das abordagens farmacológicas ( $F(1,29)=0,2957$   $P=0,5908$  para fêmeas e  $F(1,45)=0,2942$   $P=0,5902$  para machos) ou para o tratamento pós-natal ( $F=1,4720$   $P=0,2349$  para fêmeas e  $F=0,8106$   $P=0,3727$  para machos). Quanto ao desafio, não foram detectadas diferenças para as fêmeas ( $F=0,8000$   $P=0,3785$ ), apenas para os machos ( $F=5,5430$   $P=0,0230$ ). Entretanto, essa diferença não foi evidenciada no teste de Tukey para comparações múltiplas. (Figura 28A).

Quanto à porcentagem de tempo nos braços abertos do aparato não foram encontradas diferenças entre os grupos dos machos ( $F=0,7625$   $P=0,3872$ ;  $F=2,8450$   $P=0,0986$  e  $F=1,6800$

P=0,2016 para interação, abordagem pós-natal e desafio, respectivamente) e, para as fêmeas, foram detectadas diferenças referentes ao protocolo pós-natal (F=5,9660 P=0,0209) e ao desafio (F=9,1570 P=0,0052). O teste de Tukey demonstrou diferença entre os grupos S + S e D + D (P=0,0027) (Figura 28B).



**Figura 28:** Efeitos no teste do labirinto em cruz elevado do aumento agudo do tônus dopaminérgico em camundongos machos e fêmeas pré-púberes que receberam L-Dopa no período pós-natal. (A) Porcentagem de entradas no braço aberto; (B) Porcentagem de tempo nos braços abertos; (C) Tempo no centro do aparato, em segundos; (D) Número de rearings; (E) Número de Head dippings; (F) Número de Stretchings. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \*P<0,05 \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001.

A avaliação do tempo de permanência dos animais no quadrado central do labirinto também evidenciou diferenças decorrentes do desafio para fêmeas, mas que não foram detectadas no teste de Tukey ( $F=7,8130$   $P=0,0091$ ); e para os machos não foram demonstradas diferenças ( $F=0,0620$   $P=0,8044$ ;  $F=1,0810$   $P=0,3040$ ;  $F=1,5030$   $P=0,2264$  para interação, abordagem pós-natal e desafio, respectivamente) (Figura 28C).

Com relação ao número de rearings, para as fêmeas foram observadas diferenças decorrentes do desafio ( $F=22,6200$   $P<0,0001$ ) destacadas entre os grupos S+S e S+D ( $P=0,0427$ ); S+D e D+S ( $P=0,0007$ ) e D+S e D+D ( $P=0,0030$ ). Para os machos houve diferenças relativas à interação entre as abordagens farmacológicas ( $F=6,5530$   $P=0,0139$ ) e ao desafio ( $F=14,5900$   $P=0,0004$ ) evidenciadas pelo teste de Tukey entre os grupos S+S e D+D ( $P=0,0084$ ); e D+S e D+D ( $P<0,0001$ ) (Figura 28D).

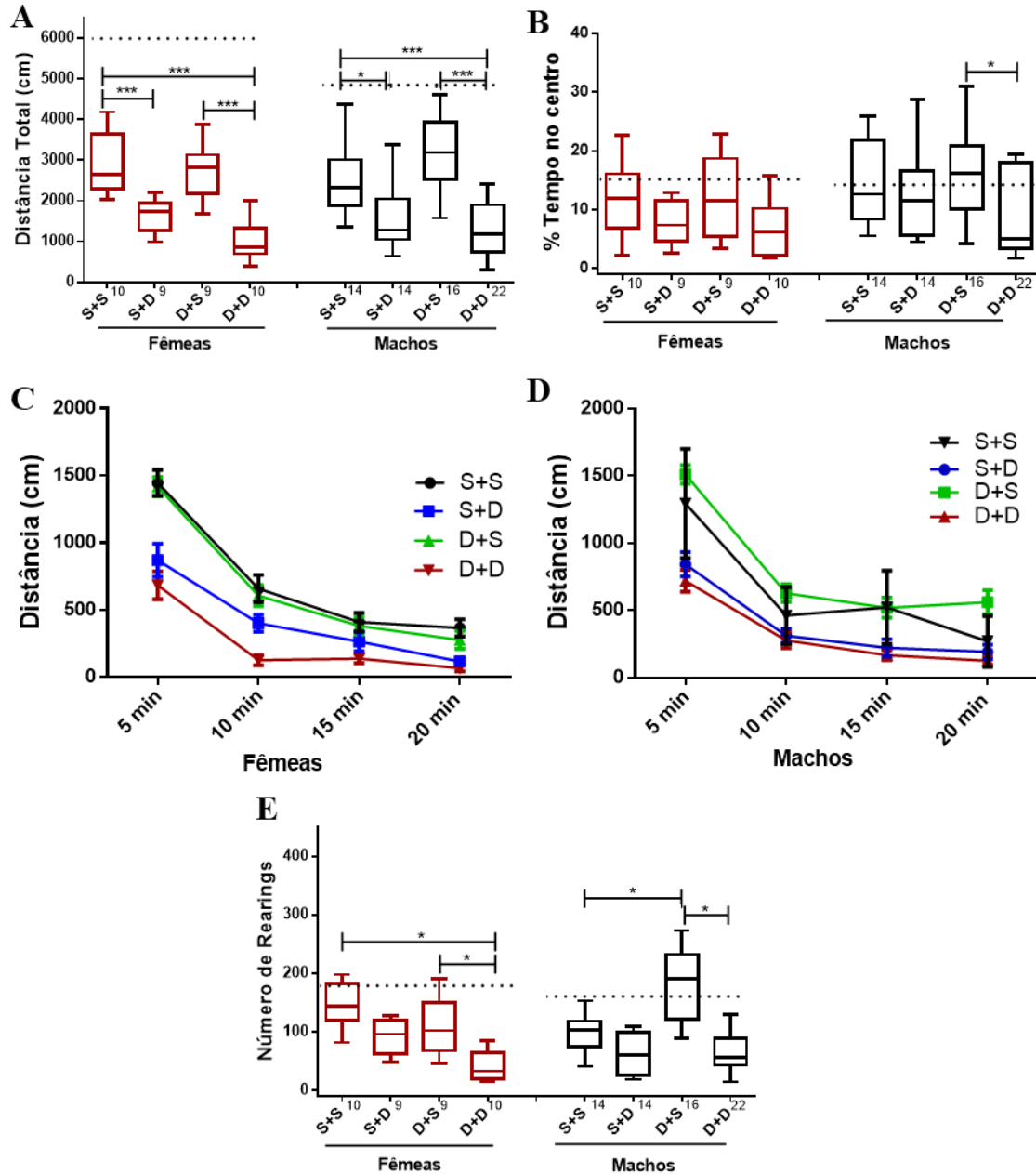
Na quantificação do comportamento de head dippings entre as fêmeas foram encontradas diferenças relativas ao desafio ( $F=12,7500$   $P=0,0013$ ) evidenciadas pelo teste de Tukey entre os grupos S+S e D+D ( $P=0,0389$ ); e D+S e D+D ( $P=0,0345$ ). Para os machos as diferenças foram devidas ao protocolo pós-natal ( $F=8,0320$   $P=0,0069$ ) detectadas pelo teste de múltiplas comparações entre os grupos S+S e D+D ( $P=0,0225$ ) (Figura 28E).

E quanto ao número de stretchings, último parâmetro avaliado neste teste, para as fêmeas foram encontradas diferenças em função do desafio ( $F=20,1800$   $P=0,0001$ ) entre os grupos S+S e D+D ( $P=0,0122$ ), S+S e S+D ( $P=0,0008$ ); S+D e D+S ( $P=0,0246$ ) e para os machos houve diferença também em função do desafio entre os grupos S+S e D+D ( $P=0,0050$ ); S+S e S+D ( $P=0,0146$ ); S+D e D+S ( $P=0,0016$ ) e D+S e D+D ( $P=0,0003$ ) (Figura 28F).

#### *4.4.1.b. Teste da caixa de atividades:*

No teste da caixa de atividades o desafio com L-Dopa nos animais que tinham passado pelo aumento do tônus dopaminérgico nos cinco primeiros dias de vida levou à redução da distância total percorrida para ambos os sexos. Para as fêmeas houve diferenças significativas referentes tanto à abordagem pós-natal quanto ao desafio ( $F(1,34)=4,6470$   $P=0,0383$  e  $F=55,8700$   $P<0,0001$  respectivamente). O teste de Tukey revelou diferenças significativas entre os grupos S+S e D+D ( $P<0,0001$ ); S+S e S+D ( $P=0,0005$ ); S+D e D+S ( $P=0,0044$ ); e D+S e D+D ( $P<0,0001$ ). Para os machos tanto a interação entre as abordagens farmacológicas quanto o desafio foram responsáveis pelas diferenças ( $F(1,62)=4,8270$   $P=0,0318$  e  $F=47,6700$   $P<0,0001$  respectivamente). Através do teste de Tukey foram identificadas diferenças entre os

grupos S+S e D+D ( $P=0,0002$ ); S+S e S+D ( $P=0,0143$ ); S+D e D+S ( $P<0,0001$ ); e D+S e D+D ( $P<0,0001$ ) (Figura 29A, C e D).



**Figura 29:** Efeitos no teste da caixa de atividades do aumento agudo do tônus dopaminérgico em camundongos machos e fêmeas pré-púberes que receberam L-Dopa no período pós-natal. (A) Distância total percorrida, em centímetros; (B) Porcentagem de tempo passado no centro da arena; (C) Distância total percorrida, em centímetros a cada 5 minutos de teste para fêmeas; (D) Distância total percorrida, em centímetros a cada 5 minutos de teste para machos (E) Número de rearings. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$ .

Quanto ao tempo de permanência no centro da caixa, não foram detectadas diferenças entre os grupos das fêmeas pelo teste de múltiplas comparações, embora tenha sido apontada variação significativa em função do desafio ( $F=6,4820$   $P=0,0156$ ). Para os machos o desafio

também foi responsável por variação significativa nos resultados ( $F=6,3220$   $P=0,0145$ ), sendo detectada diferença entre os grupos D+S e D+D ( $P=0,0121$ ) (Figura 29B).

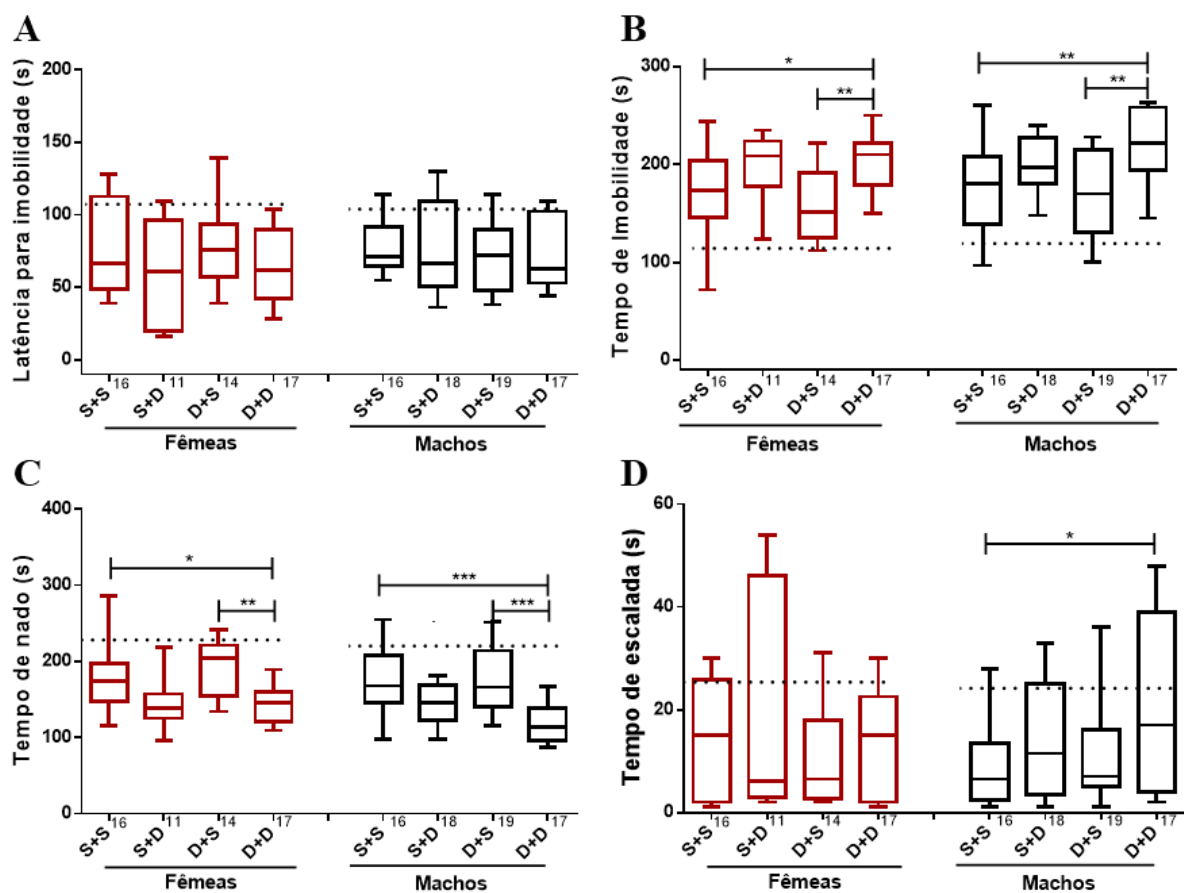
Com relação ao número de rearings, para as fêmeas houve diferença devido ao protocolo pós-natal e ao desafio ( $F=12,5300$   $P=0,0012$  e  $F=26,8600$   $P<0,0001$  respectivamente). O teste de Tukey evidenciou diferenças entre os grupos S+S e D+D ( $P<0,0001$ ); e D+S e D+D ( $P=0,0014$ ). Para os machos a interação entre as abordagens, bem como cada protocolo em si foram responsáveis pelas variações mensuradas ( $F=13,8900$   $P=0,0004$ ;  $F=19,2800$   $P<0,0001$  e  $F=53,2000$   $P<0,0001$  respectivamente). Diferenças foram detectadas entre os grupos S+S e D+S ( $P<0,0001$ ); S+D e D+S ( $P<0,0001$ ); e D+S e D+D ( $P<0,0001$ ) (Figura 29E).

#### *4.4.1.c. Teste do nado forçado:*

No teste do nado forçado não foram verificadas diferenças entre os grupo quanto à latência para o primeiro episódio de imobilidade (Figura 30A). Quanto ao tempo total de imobilidade, entre as fêmeas foram vistas diferenças devido ao desafio ( $F(1,54)=14,4100$   $P=0,0798$ ) entre os grupos S+S e D+D ( $P=0,0459$ ); D+S e D+D ( $P=0,0060$ ). Para os machos foram observadas diferenças, também relativas ao desafio, entre os grupos S+S e D+D ( $P=0,073$ ); D+S e D+D ( $P=0,0011$ ) (Figura 30B).

No tempo total de nado, para as fêmeas observamos diferenças geradas pelo desafio ( $F=18,5300$   $P<0,0001$ ) entre os grupos S+S e D+D ( $P=0,0345$ ); D+S e D+D ( $P=0,0030$ ); S+D e D+S ( $P=0,0099$ ) e para os machos, que também tiveram as diferenças influenciadas pelo desafio, S+S e D+D ( $P=0,0002$ ); D+S e D+D ( $P<0,0001$ ); S+D e D+S ( $P=0,0255$ ) (Figura 30C).

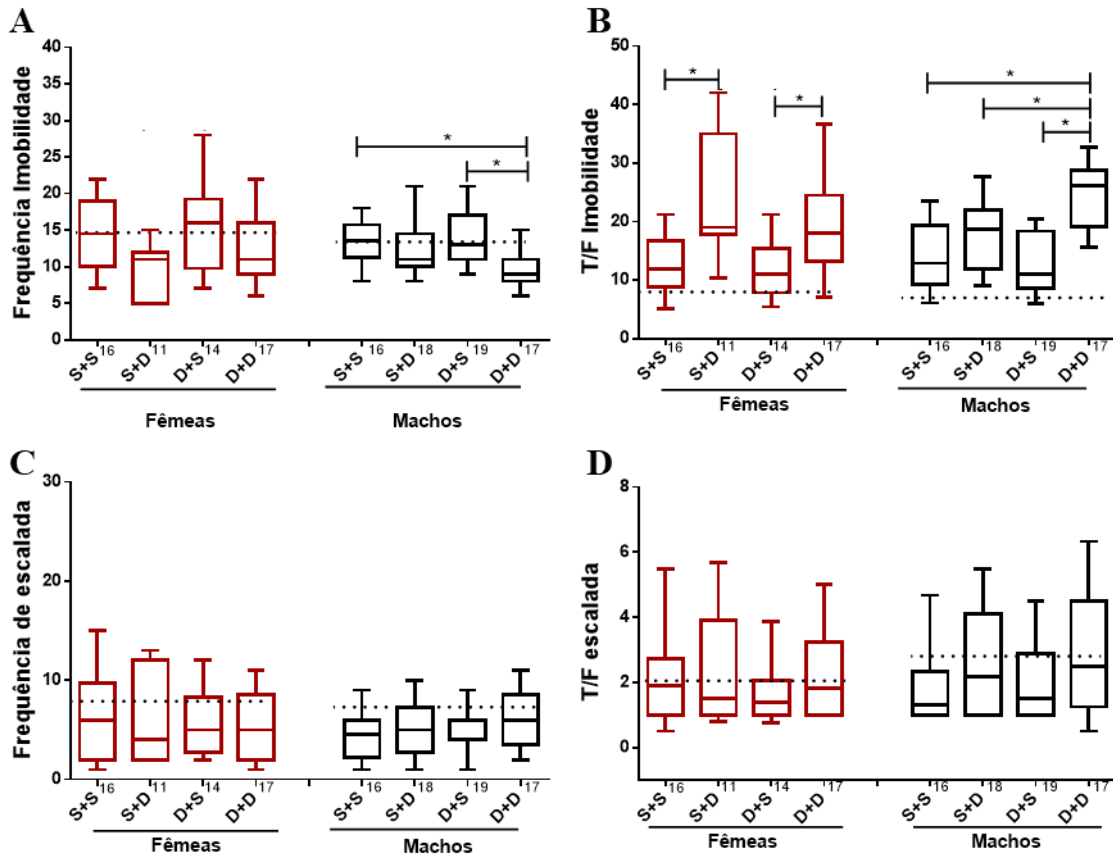
A análise do tempo total em que os animais exibiram comportamento de escalada não revelou diferenças para fêmeas. Os machos exibiram diferenças significativas influenciadas pelo desafio ( $F=6,9060$   $P=0,0107$ ) evidenciadas pelo teste de múltiplas comparações entre os grupos S+S e D+D ( $P=0,0380$ ) (Figura 30D).



**Figura 30:** Efeitos no teste do nado forçado do aumento agudo do tônus dopaminérgico em camundongos machos e fêmeas pré-púberes que receberam L-Dopa no período pós-natal. (A) Latência para primeiro episódio de imobilidade, em segundos; (B) Tempo total de imobilidade durante o teste, em segundos (C) Tempo total de nado durante o teste, em segundos; (D) Tempo total de escalada durante o teste, em segundos. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$ .

Com relação à frequência dos episódios de imobilidade, para as fêmeas identificamos que o desafio foi uma fonte de variação dos resultados ( $F=9,5900$   $P=0,0031$ ), que foi significativa apenas entre os grupos S+D e D+S ( $P=0,0220$ ). Para os machos as diferenças foram devidas tanto a interação dos protocolos quanto pelo desafio ( $F=6,4250$   $P=0,0136$  e  $F=13,5000$   $P=0,0005$  respectivamente), evidenciadas pelo teste de Tukey entre S+S e D+D ( $P=0,0030$ ) e S+D e D+D ( $P=0,0234$ ) e D+S e D+D ( $P=0,0002$ ) (Figura 31A). A razão entre o tempo e a frequência do comportamento de imobilidade revelou diferenças para as fêmeas em função do desafio ( $F=22,6300$   $P < 0,0001$ ) detectadas entre os grupos S+S e S+D ( $P=0,0019$ ); S+D e D+S ( $P=0,0010$ ); D+S e D+D ( $P=0,0290$ ). Para os machos, por sua vez, a interação entre as abordagens, o protocolo pós natal e o desafio foram responsáveis pelas variações ( $F=10,8300$   $P=0,0016$ ;  $F=5,5940$   $P=0,0210$  e  $F=33,0700$   $P < 0,0001$  respectivamente) apontadas pelo teste de Tukey entre os grupos S+S e D+D ( $P < 0,0001$ ); S+D e D+D ( $P=0,0009$ ); D+S e D+D ( $P < 0,0001$ ) (Figura 31B).

Quanto à frequência do comportamento de escalada, não foram vistas diferenças para fêmeas ou machos (Figura 31C). O mesmo ocorreu com a razão entre tempo e frequência de escalada (Figura 31D).



**Figura 31:** Efeitos no teste do nado forçado do aumento agudo do tónus dopaminérgico em camundongos machos e fêmeas pré-púberes que receberam L-Dopa no período pós-natal. (A) Frequência de episódios de imobilidade; (B) Razão Tempo/Frequência de imobilidade; (C) Frequência de episódios de comportamento de escalada; (D) Razão Tempo/Frequência de escalada. Dados mostrados com mediana e desvio padrão. A linha pontilhada indica a média dos animais Naive. O número de animais em cada grupo está indicado abaixo do boxplot. \*P<0,05 \*\*P<0,01 \*\*\* P<0,001.

#### 4.5 DISCUSSÃO

“Priming” de receptores é o fenômeno pelo qual a administração repetida de agonistas produz uma supersensibilização duradoura dos receptores, evidenciada por comportamentos estereotipados quando desafiados novamente com o agonista (KOSTRZEWA, 1995; BRUS *et al.*, 2003; KOSTRZEWA *et al.*, 2004). A supersensibilidade do receptor D2 induzida pelo quinpirole está associada a déficits cognitivos, déficit na inibição pré-pulso e em fatores neurotróficos e baixos níveis do transcrito regulador da sinalização da proteína G RGS9 no cérebro; e reversão aguda dessas alterações pelo agente antipsicótico olanzapina. Ratos



ontogeneticamente supersensibilizados para D2 têm validade aparente, validade de construto e capacidade preditiva como modelo para a esquizofrenia (KOSTRZEWA *et al.*, 2016).

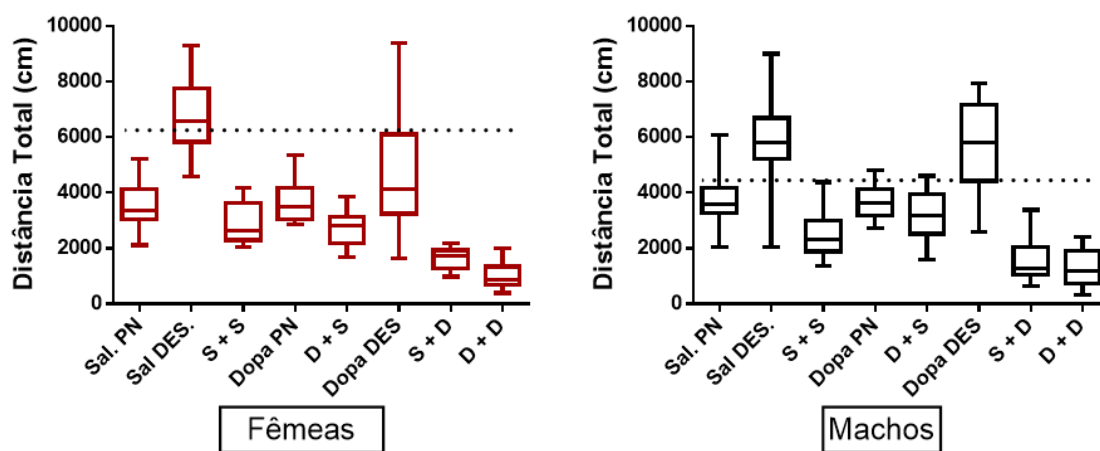
O delineamento experimental aqui aplicado tem grande potencial para gerar o efeito “priming”. Os cinco primeiros dias de vida são de intensa sinaptogênese e apoptose, além de serem marcados por menor expressão dos receptores dopaminérgicos se comparado ao cérebro adulto. E se considerarmos as diferenças hormonais no período, que levam a diferenças no tempo de maturação do sistema dopaminérgico entre os sexos, a aplicação do protocolo pode acentuar o dimorfismo sexual nas respostas comportamentais aos trinta dias de vida.

Neste protocolo experimental esperávamos verificar se as alterações causadas pela administração aguda de L-Dopa aos trinta dias seriam evidenciadas ou suprimidas se os animais tivessem recebido L-Dopa nos cinco primeiros dias de vida. Já tínhamos observado que o aumento do tônus dopaminérgico no período pós-natal foi capaz de alterar o comportamento de análise de risco no teste do labirinto em cruz elevado (principalmente para os machos), a adaptação dos machos a um ambiente desconhecido no teste da caixa de atividades, o comportamento tipo depressivo dos machos no teste do nado forçado e o comportamento anedônico no teste da neofagia. Além disso, a administração de SKF 38393 neste período levou à redução da arborização neural no hipocampo das fêmeas. O desafio com agonistas dopaminérgicos aos trinta dias de vida por sua vez, alterou o comportamento de análise de risco principalmente das fêmeas no labirinto, reduziu o comportamento locomotor e exploratório das fêmeas na caixa de atividades e alterou o comportamento tipo depressivo para ambos os sexos no teste do nado forçado.

No teste do labirinto em cruz elevado, para as fêmeas, a administração de L-Dopa nos cinco primeiros dias de vida seguida do desafio com L-Dopa levaram a redução do tempo de permanência nos braços abertos e do número de stretchings, rearings e head dippings. Para os machos foram observadas apenas reduções na frequência de rearings e stretchings. Entretanto estes dados devem ser interpretados com cautela já que, para ambos os sexos, essa dupla sobrecarga dopaminérgica levou à redução substancial da atividade locomotora e exploratória no teste da caixa de atividades, o que só tinha ocorrido com as fêmeas no desafio dopaminérgico. É possível que a administração de L-Dopa no período pós-natal tenha alterado a sensibilidade dos receptores nos circuitos responsáveis pelo comportamento locomotor, potencializando os efeitos do desafio dopaminérgico. E aliás, quando os resultados da caixa de atividades são analisados em intervalos de cinco minutos, percebemos que o principal

contribuinte para a redução da distância percorrida continua a ser a dose de L-Dopa antes do teste (desafio).

Ainda no teste da caixa de atividades é interessante observar que os animais que receberam salina no período pós natal e L-Dopa no desafio (S+D) exibiram atividade locomotora bastante inferior aos que receberam apenas o desafio com L-Dopa no experimento anterior, demonstrando que o estresse da manipulação nos primeiros dias de vida já é, por si, capaz de alterar o comportamento dos animais (ANDREWS; FILE, 1993). Neste trabalho optamos por utilizar o grupo que recebeu apenas veículo (salina) como controle para as análises estatísticas, entretanto, deixamos a média da resposta dos animais naive em cada gráfico para demonstrar a relevância da manipulação dos animais para aplicação dos protocolos experimentais sobre os resultados obtidos. Animais naive são aqueles que não passaram por manipulação no período pós-natal, sendo apenas habituados ao experimentador após o desmame. Os gráficos a seguir trazem um resumo da atividade locomotora de acordo com cada protocolo aplicado e separados por sexo, para permitir melhor visualização (Figura 32):



**Figura 32:** Resumo dos resultados de atividade locomotora. PN=pós natal (5 primeiros dias de vida) DES=desafio

No teste do nado forçado animais que receberam L-Dopa no período pós-natal e foram novamente desafiados com L-Dopa exibiram maior tempo de imobilidade e menor tempo de nado, para ambos os sexos, e para os machos ainda houve redução da frequência de imobilidade. Esse duplo aumento do tônus dopaminérgico não foi, entretanto, capaz de reduzir a latência para o primeiro episódio de imobilidade como havia ocorrido para os machos no protocolo do desafio. De modo geral, a dupla administração de L-Dopa levou à manifestação de fenótipo tipo depressivo de modo semelhante ao já visto no teste do desafio dopaminérgico. No protocolo de administração pós-natal, este fenótipo foi visto apenas nos machos que receberam

quinpirole, mas ainda assim de forma menos evidente. Esses achados permitem sugerir que janelas desenvolvimentais diferentes apresentam mecanismos de susceptibilidade distintos, corroborando os dados da literatura de diferenças no perfil de expressão dos receptores dopaminérgicos ao longo do desenvolvimento.

Por limitações técnicas este protocolo não foi realizado com os agonistas específicos D1 e D2, mas apenas com L-Dopa na dosagem de 50mg/kg. Nos delineamentos anteriores pudemos perceber que a administração de quinpirole e SKF 38393 levava a manifestações comportamentais distintas, por vezes até antagônicas entre machos e fêmeas. Seria interessante verificar as consequências do desafio após a sensibilização de receptores específicos, também devido ao fato de que a redução substancial da atividade locomotora causada pela dupla administração de L-Dopa limitou a avaliação do fenótipo de ansiedade.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- A administração dos agonistas quinpirole e SKF 38393 durante os cinco primeiros dias de vida é capaz de alterar o comportamento de camundongos pré-púberes machos, tendo SKF levado à emergência de comportamentos do tipo ansioso e quinpirole do tipo depressivo.
- A administração dos agonistas quinpirole e SKF 38393 durante os cinco primeiros dias de vida é capaz de alterar o comportamento das fêmeas pré-púberes no teste da neofagia, efeito que nos machos foi causado apenas pela administração de L-Dopa 50 mg/kg.
- Embora tenham apresentado maior resiliência às alterações comportamentais, as fêmeas que receberam o agonista D1 SKF 38393 no período pós-natal apresentaram redução na arborização neural do hipocampo.
- A administração aguda de L-Dopa, quinpirole e SKF 38393 aos 30 dias de vida altera o comportamento locomotor e exploratório das fêmeas, além de levar à manifestação de comportamentos tipo ansioso e depressivo em fêmeas e machos.
- A administração de L-Dopa nos cinco primeiros dias de vida é capaz de potencializar alguns dos fenótipos comportamentais causados pelo desafio dopaminérgico, mas não todos, o que sugere que algumas das alterações induzidas pelo aumento do tônus pós-natal podem ser revertidas antes da puberdade, ou requerem ativação de receptores específicos.

Tomadas em conjunto, estas observações permitem inferir que as janelas desenvolvimentais aqui estudadas são bastante susceptíveis a intervenções, com potencial para gerar alterações no tecido neural refletidas em alterações comportamentais, que podem ou não ser permanentes.

Este trabalho produziu dados relevantes acerca da sinalização dopaminérgica em janelas desenvolvimentais ricas em eventos, críticas para a manipulação farmacológica e ainda assim carentes de pesquisas. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos moleculares que sustentam as manifestações comportamentais aqui demonstradas, e sua relevância para a etiologia de patologias associadas a alterações no sistema dopaminérgico durante o desenvolvimento.

## 6. REFERÊNCIAS

ALLEN, E. *et al.* L-DOPA reverses motor deficits associated with normal aging in mice. **Neuroscience Letters**, v. 489, n. 1, p. 1–4, 2011.

ALOTAIBI, M. F. Physiology of puberty in boys and girls and pathological disorders affecting its onset. **Journal of Adolescence**, v. 71, p. 63–71, 2019.

ANDERSEN, S. L. *et al.* Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. **Synapse**, v. 37, n. 2, p. 167–169, 2000.

ANDREWS, N.; FILE, S. E. Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. **European Journal of Pharmacology**, v. 235, n. 1, p. 109–112, 1993.

ANYAN, J.; AMIR, S. Too Depressed to Swim or Too Afraid to Stop? A Reinterpretation of the Forced Swim Test as a Measure of Anxiety-Like Behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 5, p. 931–933, 2018.

ARAKI, K. Y.; SIMS, J. R.; BHIDE, P. G. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. **Brain Research**, v. 1156, n. 1, p. 31–45, 2007.

ARIAS-CARRIÓN, O. *et al.* Dopaminergic reward system: a short integrative review. **International archives of medicine**, v. 3, p. 24, jan. 2010.

ARNOLD, S. E.; RUSCHEINSKY, D. D.; HAN, L. Y. Further evidence of abnormal cytoarchitecture of the entorhinal cortex in schizophrenia using spatial point pattern analyses. **Biological Psychiatry**, v. 42, n. 8, p. 639–647, 1997.

ARNSTEN, A. F. T. Prefrontal cortical network connections: Key site of vulnerability in stress and schizophrenia. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 215–223, 2011.

B.A., C. *et al.* The Schizophrenia Prodrome Revisited: A Neurodevelopmental Perspective. **Schizophrenia Bulletin**, v. 29, n. 4, p. 633–651, 2003.

BADGAIYAN, R. D. *et al.* Attenuated tonic and enhanced phasic release of dopamine in attention deficit hyperactivity disorder. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–14, 2015.

BAILEY, K. R.; CRAWLEY, J. N. Chapter 5 Anxiety - Related Behaviors in Mice. In: **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. [s.l: s.n.]. p. 21–26.

BAMBICO, F. R. *et al.* Chronic exposure to cannabinoids during adolescence but not during adulthood impairs emotional behaviour and monoaminergic neurotransmission. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 3, p. 641–55, mar. 2010.

BATTY, M. J. *et al.* Cortical gray matter in attention-deficit/hyperactivity disorder: a structural magnetic resonance imaging study. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 49, n. 3, p. 229–38, 2010.

- BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 1, p. 182–217, mar. 2011.
- BEAULIEU, J. M. A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 37, n. 1, p. 7–16, 2012.
- BECKER, J. B. Sexual differentiation of motivation: A novel mechanism? **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 5, p. 646–654, 2009.
- BEHNKE, M.; SMITH, V. C. Prenatal Substance Abuse: Short- and Long-term Effects on the Exposed Fetus. **Pediatrics**, v. 131, n. 3, p. e1009–e1024, 2013.
- BELUJON, P.; GRACE, A. A. Regulation of dopamine system responsivity and its adaptive and pathological response to stress. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1805, 2015.
- BENINGER, R. J.; RANALDI, R. **The effects of amphetamine, apomorphine, SKF 38393, quinpirole and bromocriptine on responding for conditioned reward in rats** **Behavioural Pharmacology**, 1992.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, v. 103, n. 1, p. 70–82, 1989.
- BLASCHKE, A. J.; WEINER, J. A.; CHUN, J. Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system. **Journal of Comparative Neurology**, v. 396, n. 1, p. 39–50, 1998.
- BLASCO-SERRA, A. *et al.* A standardization of the Novelty-Suppressed Feeding Test protocol in rats. **Neuroscience Letters**, v. 658, p. 73–78, 2017.
- BONNIN, A. *et al.* Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 5 May, p. 588–597, 2007.
- BONVICINI, C.; FARAONE, S. V.; SCASSELLATI, C. Attention-deficit hyperactivity disorder in adults: A systematic review and meta-analysis of genetic, pharmacogenetic and biochemical studies. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 7, p. 872–884, 2016.
- BORTA, A.; HÖGLINGER, G. U. Dopamine and adult neurogenesis. **Journal of neurochemistry**, v. 100, n. 3, p. 587–95, fev. 2007.
- BOUCHARD, J.-F. Protein Kinase A Activation Promotes Plasma Membrane Insertion of DCC from an Intracellular Pool: A Novel Mechanism Regulating Commissural Axon Extension. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 12, p. 3040–3050, 2004.
- BOURIN, M. *et al.* Cyamemazine as an anxiolytic drug on the elevated plus maze and light/dark paradigm in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 124, n. 1, p. 87–95, 2001.
- BOUTROS, N. *et al.* Effects of early life stress and adolescent ethanol exposure on adult cognitive performance in the 5-choice serial reaction time task in Wistar male rats. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 9–10, p. 1549–1556, 2017.

BOYSON, S. J.; ADAMS, C. E. D 1 and D 2 Dopamine Receptors in Perinatal and Adult Basal Ganglia. **Pediatric research**, v. 23390, p. Vol.41(6), p.822–31, 1997.

BRACHT, T. *et al.* White matter pathway organization of the reward system is related to positive and negative symptoms in schizophrenia. **Schizophrenia research**, v. 153, n. 1–3, p. 136–42, mar. 2014.

BRUS, R. *et al.* Ontogenetic quinpirole treatments fail to prime for D2 agonist-enhancement of locomotor activity in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Neurotoxicity Research**, v. 5, n. 5, p. 329–338, 2003.

BUTTS, K. A. *et al.* Glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex regulate stress-evoked dopamine efflux and aspects of executive function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 45, p. 18459–18464, 2011.

CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1394–1404, 2015.

CAMPOLONGO, P. *et al.* Developmental consequences of perinatal cannabis exposure: Behavioral and neuroendocrine effects in adult rodents. **Psychopharmacology**, v. 214, n. 1, p. 5–15, 2011.

CAMPOS-GARCÍA ROJAS, C. *et al.* OCD in animal models using quinpirole as dopaminergic inductor of perseverative behaviour. **Revista Médica Del Hospital General De México**, v. 78, n. 4, p. 169–176, 2015.

CASANOVA, MANUEL F ; BUXHOEVEDEN, DANIEL ; GOMEZ, J. Disruption in the inhibitory architecture of the cell minicolumn: Implications for autism". **The Neuroscientist**, v. Vol.9(6), p. pp.496-507, 2003.

CASEY, B. J.; DURSTON, S. From Behavior to Cognition to the Brain and Back : What Have We Learned From Functional Imaging Studies of Attention. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 6, p. 957–960, 2006.

CASTAGNÉ, V.; PORSOLT, R. D.; MOSER, P. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. **European Journal of Pharmacology**, v. 616, n. 1–3, p. 128–133, 2009.

CASTELLANOS, F. X. *et al.* Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Jama**, v. 288, n. 14, p. 1740–8, 2002.

CHAKRABORTI, A. *et al.* Cranial Irradiation Alters Dendritic Spine Density and Morphology in the Hippocampus. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1–10, 2012.

CHAN, J. *et al.* D1-like dopamine receptor dysfunction in the lateral habenula nucleus increased anxiety-like behavior in rat. **Neuroscience**, v. 340, p. 542–550, 2017.

CHAUDHURY, D. *et al.* Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 532–536, 2013a.

CHAUDHURY, D. *et al.* Rapid regulation of depression-related behaviours by control of

midbrain dopamine neurons. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 532–536, 2013b.

CHRISTOPH, G. R.; LEONZIO, R. J.; WILCOX, K. S. Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 6, n. March, p. 613–619, 1986.

CIVELLI, O. Molecular Diversity of the Dopamine Receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 281–307, 1993.

COSTA, A. P. R. *et al.* A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 150–155, 2013.

CRANDALL, J. E. *et al.* Dopamine Receptor Activation Modulates GABA Neuron Migration from the Basal Forebrain to the Cerebral Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 14, p. 3813–3822, 2007.

CRISWELL, H.; MUELLER, R.; BREESE, G. Priming of D1-dopamine receptor responses: long-lasting behavioral supersensitivity to a D1-dopamine agonist following repeated administration to neonatal 6-OHDA-lesioned rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 125–133, 1989.

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 547–569, 2005.

DAVIES, W. Sex differences in Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Candidate genetic and endocrine mechanisms. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 331–346, 2014.

DE MATOS, L. O. *et al.* L-Dopa treatment during perinatal development leads to different behavioral alterations in female vs. male juvenile Swiss mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 173, n. August, p. 1–14, 2018.

DE MELO MARTIMIANO, P. H. *et al.* Perinatal malnutrition stimulates motivation through reward and enhances drd1a receptor expression in the ventral striatum of adult mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 134, p. 106–114, 2015.

DIAMOND, A. *et al.* Genetic and Neurochemical Modulation of Prefrontal Cognitive Functions in Children. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 1, p. 125–132, 2004.

DIAZ, J. *et al.* Selective Expression of Dopamine D3 Receptor mRNA in Proliferative Zones during Embryonic Development of the Rat Brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 11, p. 4282–4292, 1997.

DRAKE, J. D. *et al.* Abnormal involuntary movement (AIM) expression following D2 dopamine agonist challenge is determined by the nature of prior dopamine receptor stimulation (priming) in 6-hydroxydopamine lesioned rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 105, p. 26–33, 2013.

DUARTE, C. *et al.* Respective roles of dopamine D2 and D3 receptors in food-seeking behaviour in rats. **Psychopharmacology**, v. 166, n. 1, p. 19–32, 2003.

DUKE, M. A.; O'NEAL, J.; MCDUGALL, S. A. Ontogeny of dopamine agonist-induced



sensitization: Role of NMDA receptors. **Psychopharmacology**, v. 129, n. 2, p. 153–160, 1997.

DUNLOP, B.; NEMEROFF, C. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, n. 3, p. 327–337, 2007.

EAGLE, D. M. *et al.* The dopamine D2/D3 receptor agonist quinpirole increases checking-like behaviour in an operant observing response task with uncertain reinforcement: A novel possible model of OCD. **Behavioural Brain Research**, v. 264, p. 207–229, 2014.

FARAONE, S. V. *et al.* Attention-deficit hyperactivity disorder. **Nature Reviews**, v. 1, p. 1–23, 2015.

FITZSIMMONS, J.; KUBICKI, M.; SHENTON, M. E. Review of functional and anatomical brain connectivity findings in schizophrenia. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 26, n. 2, p. 172–187, 2013.

FLEMING, S. M. *et al.* Behavioral effects of dopaminergic agonists in transgenic mice overexpressing human wildtype  $\alpha$ -synuclein. **Neuroscience**, v. 142, n. 4, p. 1245–1253, 2006.

FRANGO, S. Schizophrenia. **PSYCHIATRIC DISORDERS**, p. 405–409, 2008.

FUSAR-POLI, P.; MEYER-LINDENBERG, A. Striatal presynaptic dopamine in schizophrenia, part I: Meta-analysis of dopamine active transporter (DAT) density. **Schizophrenia Bulletin**, v. 39, n. 1, p. 22–32, 2013a.

FUSAR-POLI, P.; MEYER-LINDENBERG, A. Striatal presynaptic dopamine in schizophrenia, part II: Meta-analysis of [18F/11C]-DOPA PET studies. **Schizophrenia Bulletin**, v. 39, n. 1, p. 33–42, 2013b.

GABOR, C. *et al.* Rapid effects of the G-protein coupled oestrogen receptor ( GPER ) on learning and dorsal hippocampus dendritic spines in female mice. **Physiology & Behavior**, v. 149, p. 53–60, 2015.

GANAPATHY, V. Drugs of abuse and human placenta. **Life Sciences**, v. 88, n. 21–22, p. 926–930, 2011.

GAO, B.; CUTLER, M. G. Effects of quinpirole on the behaviour shown by mice in the light-dark box and during social interactions. **Neuropharmacology**, v. 32, n. 1, p. 93–100, 1993.

GASBARRI, A. *et al.* SPATIAL MEMORY IMPAIRMENT INDUCED BY LESION OF THE MESOHIPPOCAMPAL DOPAMINERGIC SYSTEM IN THE RAT. **Neuroscience**, v. 74, n. 4, 1996.

GELBARD, H. A. *et al.* Postnatal development of dopamine D1 and D2 receptor sites in rat striatum. **Brain Research**, v. 49, n. 1, p. 123–130, 1989.

GILL, M. J. *et al.* Inactivation of the lateral habenula reduces anxiogenic behavior and cocaine seeking under conditions of heightened stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 111, p. 24–29, 2013.

GOBBI, G. *et al.* Association of Cannabis Use in Adolescence and Risk of Depression,

Anxiety, and Suicidality in Young Adulthood: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Psychiatry**, p. 1–9, 2019.

GOMES, F. V.; RINCÓN-CORTÉS, M.; GRACE, A. A. Adolescence as a period of vulnerability and intervention in schizophrenia: Insights from the MAM model. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 70, p. 260–270, 2016.

GONZÁLEZ-BURGOS, I. From synaptic transmission to cognition : An intermediary role for dendritic spines. **Brain and Cognition**, v. 80, p. 177–183, 2012.

GRAHAM, J.; SETH, S.; COGHILL, D. Adhd. **Medicine**, v. 35, n. 3, p. 181–185, 2007.

HAJEK, T.; CARREY, N.; ALDA, M. Neuroanatomical abnormalities as risk factors for bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, v. 7, n. 5, p. 393–403, 2005.

HAN, D. *et al.* Dizocilpine reduces head diameter of dendritic spines in the hippocampus of adolescent rats. **Psychiatry Research**, v. 210, p. 351–356, 2013.

HATALOVA, H. *et al.* Spatial Reversal Learning in Chronically Sensitized Rats and in Undrugged Sensitized Rats with Dopamine D2-Like Receptor Agonist Quinpirole. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. April, p. 1–13, 2014.

HERLENIUS, E.; LAGERCRANTZ, H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. **Experimental Neurology**, v. 190, p. 8–21, 2004.

HOLMES, A. *et al.* Galanin GAL-RI receptor null mutant mice display increased anxiety-like behavior specific to the elevated plus-maze. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 6, p. 1031–1044, 2003.

HOLMES, A.; LACHOWICZ, J. E.; SIBLEY, D. R. Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 8, p. 1117–1134, 2004.

HONEA, R. *et al.* Regional deficits in brain volume in schizophrenia: A meta-analysis of voxel-based morphometry studies. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 12, p. 2233–2245, 2005.

IJIMA, M.; FUKUMOTO, K.; CHAKI, S. Acute and sustained effects of a metabotropic glutamate 5 receptor antagonist in the novelty-suppressed feeding test. **Behavioural Brain Research**, v. 235, n. 2, p. 287–292, 2012.

INSEL, T. R. Rethinking schizophrenia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 187–193, 2010.

JAARO-PELED, H. *et al.* Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 9, p. 485–495, 2009.

JAHNG, J. W. *et al.* Mesolimbic dopaminergic activity responding to acute stress is blunted in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. **Neuroscience**, v. 171, n. 1, p. 144–152, 2010.

JIN, H. M. *et al.* The effects of social defeat on behavior and dopaminergic markers in mice.

**Neuroscience**, v. 288, p. 167–177, 2015.

JONES, L. B. *et al.* In Utero Cocaine-Induced Dysfunction of Dopamine D1 Receptor Signaling And Abnormal Differentiation of Cerebral Cortical Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 4606–4614, 2000.

JUNG, A. B.; JR, J. P. B. Development of striatal dopaminergic function . I . Pre- and postnatal development of mRNAs and binding sites for striatal D1 ( D1a ) and D2 ! D2a ) receptors. **Developmental Brain Research**, v. 94, p. 109–120, 1996.

JUNG, E.-Y.; SHIM, I. Differential DAergic Control of D1 and D2 Receptor Agonist Over Locomotor Activity and GABA Level in the Striatum. **Experimental Neurobiology**, v. 20, n. 3, p. 153, 2011.

JURASKA, J. M.; WILLING, J. Pubertal onset as a critical transition for neural development and cognition. **Brain Research**, v. 1654, p. 87–94, 2017.

KAHN, R. S. *et al.* Schizophrenia. **Nature Reviews**, v. 1, n. November, p. 102–113, 2015.

KALSBECK, A. *et al.* Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 269, n. 1, p. 58–72, 1988.

KANE, L.; ISMAIL, N. Puberty as a vulnerable period to the effects of immune challenges : Focus on sex differences. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 374–382, 2017.

KAPUR, S.; REMINGTON, G. Dopamine D2 receptors and their role in atypical antipsychotic action: Still necessary and may even be sufficient. **Biological Psychiatry**, v. 50, n. 11, p. 873–883, 2001.

KARKHANIS, A. N. *et al.* Early-life social isolation stress increases kappa opioid receptor responsiveness and downregulates the dopamine system. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 9, p. 2263–2274, 2016.

KHAN, A.; BERGER, R. G.; DE CATANZARO, D. The onset of puberty in female mice as reflected in urinary steroids and uterine/ovarian mass: Interactions of exposure to males, phyto-oestrogen content of diet, and ano-genital distance. **Reproduction**, v. 135, n. 1, p. 99–106, 2008.

KIRLEY, A. *et al.* Dopaminergic System Genes in ADHD : Toward a Biological Hypothesis. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 04, p. 607–619, 2002.

KNOLL, L. J. *et al.* A Window of Opportunity for Cognitive Training in Adolescence. **Psychological Science**, v. 27, n. 12, p. 1620–1631, 2016.

KOKRAS, N. *et al.* Forced swim test: What about females? **Neuropharmacology**, v. 99, p. 408–421, 2015.

KOSS, W. A. *et al.* Dendritic remodeling in the adolescent medial prefrontal cortex and the basolateral amygdala of male and female rats. **Synapse**, v. 68, n. 2, p. 61–72, 2014.

KOSTRZEWA, R. M. Dopamine receptor supersensitivity. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 19, n. 1, p. 1–17, 1995.

KOSTRZEWA, R. M. *et al.* Dopamine D2 agonist priming in intact and dopamine-lesioned rats. **Neurotoxicity Research**, v. 6, n. 6, p. 457–462, 2004.

KOSTRZEWA, R. M. *et al.* Perinatal treatments with the dopamine D2-receptor agonist quinpirole produces permanent D2-receptor supersensitization: A model of schizophrenia. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 1–2, p. 183–192, 2016.

KRITZER, M. F.; CREUTZ, L. M. Region and Sex Differences in Constituent Dopamine Neurons and Immunoreactivity for Intracellular Estrogen and Androgen Receptors in Mesocortical Projections in Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 38, p. 9525–9535, 2008.

KULESSKAYA, N.; VOIKAR, V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. **Physiology and Behavior**, v. 133, p. 30–38, 2014.

LAGUNA, L.; ISLANDS, C. Dopaminergic Neuron Development in Rats : Biochemical Study From Prenatal Life to Adulthood. **Brain Research Bulletin**, n. 17, p. 7–13, 1992.

LANGE, M. *et al.* The ADHD-susceptibility gene *lphn3.1* modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 9, p. 946–954, 2012.

LERICHE, L. *et al.* The Dopamine D3 Receptor: A Therapeutic Target for the Treatment of Neuropsychiatric Disorders. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 5, n. 1, p. 25–43, 2008.

LEVITT, P. *et al.* New evidence for neurotransmitter influences on brain development. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 6, p. 269–274, 1997.

LI, L.; SAGOT, B.; ZHOU, F. M. Similar l-dopa-stimulated motor activity in mice with adult-onset 6-hydroxydopamine-induced symmetric dopamine denervation and in transcription factor *Pitx3* null mice with perinatal-onset symmetric dopamine denervation. **Brain Research**, v. 1615, p. 12–21, 2016.

LISMAN, J. E.; GRACE, A. A. The Hippocampal-VTA Loop : Controlling the Entry of Information into Long-Term Memory. **Neuron**, v. 46, p. 703–713, 2005.

LODGE, D. J.; GRACE, A. A. Developmental pathology, dopamine, stress and schizophrenia. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 207–213, 2011a.

LODGE, D. J.; GRACE, A. A. Hippocampal dysregulation of dopamine system function and the pathophysiology of schizophrenia. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 9, p. 507–513, 2011b.

LOI, M. *et al.* Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. **Neuroscience**, v. 342, p. 101–119, 2017.

LUQUE-ROJAS, M. J. *et al.* Hyperactivity induced by the dopamine D2/D3receptor agonist quinpirole is attenuated by inhibitors of endocannabinoid degradation in mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 3, p. 661–676, 2013.

LYON, G. J. *et al.* Presynaptic regulation of dopamine transmission in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 37, n. 1, p. 108–117, 2011.

MADRAS, B. K. Dopamine challenge reveals neuroadaptive changes in marijuana abusers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 33, p. 11915–11916 COMMENTARY, 2014.

MARKHAM, J. A.; MORRIS, J. R.; JURASKA, J. M. Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood. **Neuroscience**, v. 144, n. 3, p. 961–968, 2007.

MARSH, R.; GERBER, A. J.; PETERSON, B. S. Neuroimaging studies of normal brain development and their relevance for understanding childhood neuropsychiatric disorders. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 47, n. 11, p. 1233–1251, 2008.

MATHIS, V. *et al.* Excitatory transmission to the lateral habenula is critical for encoding and retrieval of spatial memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 12, p. 2843–2851, 2015.

MCEWEN, B. S.; NASCA, C.; GRAY, J. D. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 3–23, 2016.

MCKINNEY, R. A. Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. **The Journal of Physiology**, v. 1, p. 107–116, 2010.

MEYER, N.; MACCABE, J. H. Schizophrenia. **PSYCHIATRIC DISORDERS**, p. 586–590, 2012.

MILLS, K. L. *et al.* Structural brain development between childhood and adulthood: Convergence across four longitudinal samples. **NeuroImage**, v. 141, p. 273–281, 2016.

MISSALE, C. *et al.* Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological reviews**, v. 78, n. 1, p. 189–225, 1998.

MORELLI, M. *et al.* Time and dose dependence of the “priming” of the expression of dopamine receptor supersensitivity. **European Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 2, p. 329–335, 1989.

MORRISON, P. D.; MURRAY, R. M. Schizophrenia. **Current biology : CB**, v. 15, n. 24, p. R980-4, 20 dez. 2005.

MURRAY, R. M. *et al.* A developmental model for similarities and dissimilarities between schizophrenia and bipolar disorder. **Schizophrenia research**, v. 71, n. 2–3, p. 405–16, 2004.

NETTER, P. Dopamine challenge tests as an indicator of psychological traits. **Human Psychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 91–99, 2006.

O'DONNELL, P. Adolescent maturation of cortical dopamine. **Neurotoxicity Research**, v. 18, n. 3–4, p. 306–312, 2010.

OHTANI, N. *et al.* Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. **The**

**Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 2840–50, 2003.

ORLOWSKI, D.; BJARKAM, C. R. A simple reproducible and time saving method of semi-automatic dendrite spine density estimation compared to manual spine counting. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 208, p. 128–133, 2012.

OSTADHADI, S. *et al.* Antidepressant effect of pramipexole in mice forced swimming test: A cross talk between dopamine receptor and NMDA/nitric oxide/cGMP pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 81, p. 295–304, 2016.

OTTE, C. *ET AL.* Major depressive disorder. **Nature Reviews**, v. 2, n. Mdd, p. 79–90, 2016.

OVERSTREET, D. H. Modeling Depression in Animal Models. In: **Psychiatric Disorders: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 829p. 125–144.

OVTCHAROFF, W. *et al.* Sex differences in densities of dopaminergic fibers and GABAergic neurons in the prenatal rat striatum. **Journal of Comparative Neurology**, v. 323, n. 2, p. 299–304, 1992.

PACKARD, M. G.; WHITE, N. M. Dissociation of Hippocampus and Caudate Nucleus Memory Systems by Posttraining Intracerebral Injection of Dopamine Agonists. **Behavioral Neuroscience**, v. 105, n. 2, p. 295–306, 1991.

PARK, Y.; WALDMAN, I. D. Influence of the COMT val(108/158)met polymorphism on continuous performance task indices. **Neuropsychologia**, v. 61, p. 45–55, ago. 2014.

PAUL, M. L.; CURRIE, R. W.; ROBERTSON, H. A. Priming of a D1 dopamine receptor behavioural response is dissociated from striatal immediate-early gene activity. **Neuroscience**, v. 66, n. 2, p. 347–59, 1995.

PEI, L. *et al.* Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. **Nature Medicine**, v. 16, n. 12, p. 1393–1395, 2010.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PENDLETON, R. G. *et al.* A new role for catecholamines: Ontogenesis. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 7, p. 248–251, 1998.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: A review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177, n. 3, p. 245–255, 2005.

PIAZZA, P. V. *et al.* Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 16, p. 8716–8720, 1996.

POWELL, T. R.; FERNANDES, C.; SCHALKWYK, L. C. Depression-Related Behavioral Tests. **Current Protocols in Mouse Biology**, v. 2, n. June, p. 119–127, 2012.

PRAKASH, N.; WURST, W. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain.

**Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 2, p. 187–206, 2006.

PROULX, C. D.; HIKOSAKA, O.; MALINOW, R. Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 9, p. 1146–52, 2014.

PRUESSNER, J. C. . F. C. M. J. M. A. D. Dopamine Release in Response to a Psychological Stress in Humans and Its Relationship to Early Life Maternal Care: A Positron Emission Tomography Study Using [11C]Raclopride. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 2825–2831, 2004.

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

R.G., L. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. t 987, p. 180–185, 1987.

RANJAN, A.; MALLICK, B. N. A modified method for consistent and reliable Golgi-Cox staining in significantly reduced time. **Frontiers in Neurology**, v. DEC, n. December, p. 1–8, 2010.

RAPOPORT, J. L. *et al.* The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. **Molecular psychiatry**, v. 10, n. 5, p. 434–49, 2005.

RASHEED, N. *et al.* Differential response of central dopaminergic system in acute and chronic unpredictable stress models in rats. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 1, p. 22–32, 2010.

RICE, D.; JR, S. B. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. June, p. 511–533, 2000.

ROBBINS, L. N.; MILLS, J. L. Effects of in utero exposure to street drugs. **American Journal of Public Health**, v. 83, n. Suppl, p. 1–32, 1993.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, Defence and the Elevated Plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801–810, 1997.

RONDOU, P.; HAEGEMAN, G.; VAN CRAENENBROECK, K. The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 67, n. 12, p. 1971–1986, 2010.

ROSOKLIJA, G. *et al.* Structural Abnormalities of Subicular Dendrites in Subjects With Schizophrenia and Mood Disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 57, p. 349–356, 2000.

ROSS, C. A. *et al.* Neurobiology of Schizophrenia. **Neuron**, v. 52, p. 139–153, 2006.

ROSS, E. J. *et al.* Developmental consequences of fetal exposure to drugs: What we know and what we still must learn. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 1, p. 61–87, 2015.

- ROTH, K. A.; KATZ, R. J. Stress, behavioral arousal, and open field activity-A reexamination of emotionality in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 3, n. 4, p. 247–263, 1979.
- RUBIO, P. *et al.* Long-term behavioral effects of perinatal exposure to  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in rats: Possible role of pituitary-adrenal axis. **Life Sciences**, 1995.
- SADASIVAN, S. *et al.* Methylphenidate exposure induces dopamine neuron loss and activation of microglia in the basal ganglia of mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–9, 2012.
- SADEGHZADEH, F.; BABAPOUR, V.; HAGHPARAST, A. Role of dopamine D1-like receptor within the nucleus accumbens in acute food deprivation- and drug priming-induced reinstatement of morphine seeking in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 287, p. 172–181, 2015.
- SCATTON, B. *et al.* Origin of dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation. **Neuroscience Letters**, v. 18, p. 125–131, 1980.
- SCHAMBRA, U. B. *et al.* ONTOGENY OF D1A AND D2 DOPAMINE RECEPTOR SUBTYPES IN RAT BRAIN USING IN SITU AND RECEPTOR BINDING. **Neuroscience**, v. 62, n. 1, p. 65–85, 1994.
- SCHMIDT, U. *et al.* ACTIVATION OF DOPAMINERGIC D 1 RECEPTORS PROMOTES MORPHOGENESIS OF DEVELOPING STRIATAL NEURONS. **Neuroscience**, v. 74, n. 2, p. 453–460, 1996.
- SCHULTZ, W. Behavioral dopamine signals. 2007.
- SCHULTZ, W. Updating dopamine reward signals. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, n. 2, p. 229–238, 2013.
- SCHULZ, K. M.; MOLENDIA-FIGUEIRA, H. A.; SISK, C. L. Back to the Future: The Organizational-Activational Hypothesis Adapted to Puberty and Adolescence. **Hormones and behavior**, v. 55, n. 5, p. 597–604, 2009.
- SEEMAN, P. Targeting the dopamine D 2 receptor in schizophrenia . **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 10, n. 4, p. 515–531, 2006.
- SEEMAN, P. Schizophrenia and dopamine receptors. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 9, p. 999–1009, 2013.
- SEEMAN, P.; KAPUR, S. Schizophrenia : More dopamine , more D 2 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 5, n. 14, p. 7673–7675, 2000.
- SEGAL, M. Dendritic spines , synaptic plasticity and neuronal survival : activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. April, p. 2178–2184, 2010.
- SEO, J. H.; KUZHIKANDATHIL, E. V. Dopamine D3 receptor mediates preadolescent stress-induced adult psychiatric disorders. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–18, 2015.
- SHEARMAN, L.P. ; COLLINS, L.M. ; MEYER, J. S. Characterization and localization of [



125 IJRTI-55-labeled cocaine binding sites in fetal and adult rat brain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277(3), p. 1770–1783, 1996.

SHEARMAN, L. P.; ZEITZER, J.; WEAVER, D. R. Widespread expression of functional D<sub>1</sub>-dopamine receptors in fetal rat brain. **Developmental Brain Research**, n. 102, p. 105–115, 1997.

SILLIVAN, S. E.; KONRADI, C. Expression and function of dopamine receptors in the developing medial frontal cortex and striatum of the rat. **Neuroscience**, v. 199, p. 501–514, 2011.

SIMOLA, N. *et al.* Priming of rotational behavior by a dopamine receptor agonist in hemiparkinsonian rats: Movement-dependent induction. **Neuroscience**, v. 158, n. 4, p. 1625–1631, 2009.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 2012.

SMILLIE, L. D.; WACKER, J. Dopaminergic foundations of personality and individual differences. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, n. October, p. 2013–2015, 2014.

SOARES-CUNHA, C. *et al.* Mild Prenatal Stress Causes Emotional and Brain Structural Modifications in Rats of Both Sexes. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. July, p. 1–15, 2018.

SOUZA, B. R.; ROMANO-SILVA, M. A.; TROPEPE, V. Dopamine D<sub>2</sub> receptor activity modulates Akt signaling and alters GABAergic neuron development and motor behavior in zebrafish larvae. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 14, p. 5512–25, 6 abr. 2011.

SOUZA, B. R.; TROPEPE, V. The role of dopaminergic signalling during larval zebrafish brain development: a tool for investigating the developmental basis of neuropsychiatric disorders. **Reviews in the neurosciences**, v. 22, n. 1, p. 107–19, jan. 2011.

SOUZA, R. P. *et al.* Methylphenidate alters NCS-1 expression in rat brain. **Neurochemistry international**, v. 53, n. 1–2, p. 12–6, jul. 2008.

STANDAERT, D. G.; GALANTER, J. M. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In: **Guanabara Koogan**. [s.l: s.n.]. p. 166–185.

STANWOOD, G. D.; LEVITT, P. Prenatal Exposure to Cocaine Produces Unique Developmental and Long-Term Adaptive Changes in Dopamine D<sub>1</sub> Receptor Activity and Subcellular Distribution. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 152–157, 2007.

SUBCOMMITTEE ON ATTENTION-DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER, S. C. O. Q. I. A. M. ADHD: Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents. **Pediatrics**, v. 128, n. 5, p. 1007–1024, 2012.

SUNDSTRM, E. *et al.* Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. v. 75, n. 1993, p. 1–12, 1993.

- TEICHER, M. H.; ANDERSEN, S. L.; HOSTETTER, J. C. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. **Developmental Brain Research**, v. 89, n. 2, p. 167–172, 1995.
- TEJADA, J.; CHAIM, K. T.; MORATO, S. X-PloRat : A Software for Scoring Animal Behavior in Enclosed Spaces. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 33, p. 1–4, 2017.
- TIAN, J.; UCHIDA, N. Habenula Lesions Reveal that Multiple Mechanisms Underlie Dopamine Prediction Errors. **Neuron**, v. 87, n. 6, p. 1304–1316, 2015.
- TODD, R. D. Neural Development Is Regulated by Classical Neurotransmitters : Dopamine D2 Receptor Stimulation Enhances Neurite Outgrowth. **Biological Psychiatry**, v. 31, p. 794–807, 1992.
- TRAINOR, B. C. Stress responses and the mesolimbic dopamine system: Social contexts and sex differences. **Hormones and Behavior**, v. 60, n. 5, p. 457–469, 2011.
- TYE, K. M. *et al.* Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 537–541, 2013.
- VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 1, p. 125–132, 2000.
- VAN DER KOLK, B. A. *et al.* Disorders of extreme stress: The empirical foundation of a complex adaptation to trauma. **Journal of Traumatic Stress**, v. 18, n. 5, p. 389–399, 2005.
- VAN ERP, T. G. M. *et al.* Subcortical brain volume abnormalities in 2028 individuals with schizophrenia and 2540 healthy controls via the ENIGMA consortium. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 4, p. 547–553, 2016.
- VOLKMAR, F. R. Pharmacological Interventions in Autism : Theoretical and Practical Issues. **Journal of Clinical Child Psychology**, v. 30, n. March 2001, p. 80–87, 2001.
- WACHTEL, S. R.; BROODERSON, R. J.; WHITE, F. J. Parametric and pharmacological analyses of the enhanced grooming response elicited by the D1 dopamine receptor agonist SKF 38393 in the rat. **Psychopharmacology**, v. 109, n. 1–2, p. 41–48, 1992.
- WAHLSTROM, D.; WHITE, T.; LUCIANA, M. Neurobehavioral evidence for changes in dopamine system activity during adolescence. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 5, p. 631–648, 2010.
- WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007.
- WALKER, Q. D. *et al.* Dopamine release and uptake are greater in female than male rat striatum as measured by fast cyclic voltammetry. **Neuroscience**, v. 95, n. 4, p. 1061–1070, 2000.
- WEINSTEIN, J. J. *et al.* Pathway-Specific Dopamine Abnormalities in Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 1, p. 31–42, 2017.

- WEN, J. L. *et al.* Involvement of the dopaminergic system in the consolidation of fear conditioning in hippocampal CA3 subregion. **Behavioural Brain Research**, v. 278, p. 527–534, 2015.
- WIDOM C., S.; J., C. S.; DUMONT, K. A. A prospective investigation of major depressive disorder and comorbidity in abused and neglected children grown up. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, n. 1, p. 49–56, 2007.
- WIERENGA, L. M. *et al.* Unraveling age , puberty and testosterone e f f e c t s on subcortical brain development across adolescence. **Psychoneuroendocrinology**, v. 91, n. September 2017, p. 105–114, 2018.
- WILKERSON, A.; LEVIN, E. D. VENTRAL HIPPOCAMPAL DOPAMINE D 1 AND D 2 SYSTEMS AND SPATIAL WORKING MEMORY IN RATS. **Neuroscience**, v. 89, n. 3, p. 743–749, 1999.
- WILLING, J.; JURASKA, J. M. The timing of neuronal loss across adolescence in the medial prefrontal cortex of male and female rats. **Neuroscience**, v. 301, p. 268–275, 2015.
- WOLANSKY, M. J. *et al.* Postnatal haloperidol eliminates the deficit in circling behavior produced by prenatal exposure to the same drug. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, n. 4, p. 561–569, 2004.
- WRIGHT, C. L. *et al.* Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 9, p. 553–561, 2010.
- WU, J. *et al.* Role of dopamine receptors in ADHD: A systematic meta-analysis. **Molecular Neurobiology**, v. 45, n. 3, p. 605–620, 2012.
- XIE, C. L. *et al.* Levodopa/benserazide microsphere (LBM) prevents L-dopa induced dyskinesia by inactivation of the DR1/PKA/P-tau pathway in 6-OHDA-lesioned Parkinson's rats. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–10, 2014.
- YORGASON, J. T. *et al.* Enduring increases in anxiety-like behavior and rapid nucleus accumbens dopamine signaling in socially isolated rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 6, p. 1022–1031, 2013.
- ZALESKY, A. *et al.* Disrupted axonal fiber connectivity in schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 1, p. 80–89, 2011.
- ZAQOUT, S.; KAINDL, A. M. Golgi-Cox Staining Step by Step. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 10, n. March, p. 1–7, 2016.
- ZARRINDAST, M. R. *et al.* Anxiolytic-like effect induced by the cannabinoid CB1 receptor agonist, arachydonilcyclopropylamide (ACPA), in the rat amygdala is mediated through the D1 and D2 dopaminergic systems. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 131–140, 2011.
- ZARRINDAST, M. R. *et al.* Involvement of rat dopaminergic system of nucleus accumbens in nicotine-induced anxiogenic-like behaviors. **Brain Research**, v. 1460, p. 25–32, 2012.
- ZHANG, L. *et al.* D1 dopamine receptor regulation of the levels of the cell-cycle-controlling

proteins, cyclin D, P27 and Raf-1, in cerebral cortical precursor cells is mediated through cAMP-independent pathways. **Cerebral Cortex**, v. 15, n. 1, p. 74–84, 2005.

ZHANG, X. *et al.* Essential Role for Synaptopodin in Dendritic Spine Plasticity of the Developing Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 30, p. 12510–12518, 2013.

ZHOU, Q. Y.; PALMITER, R. D. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1197–1209, 1995.