

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA
E GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO**

JÉSSICA CORDEIRO DE OLIVEIRA SQUARIZ

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO METILFENIDATO EM UM
MODELO GENÉTICO RELACIONADO A ENDOFENÓTIPOS
DO TDAH**

Dissertação submetida ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Geison de Souza Izídio

**FLORIANÓPOLIS
2018**

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

Squariz, Jéssica Cordeiro de Oliveira
Investigação dos efeitos do metilfenidato em um
modelo genético relacionado à endofenótipos do TDAH.
/ Jéssica Cordeiro de Oliveira Squariz ;
orientador, Geison de Souza Izídio , 2018.
89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
TDAH . 3. ritalina . 4. endofenótipos. 5.
hiperatividade . I. Izídio , Geison de Souza . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. III. Título.

"Investigação dos efeitos do metilfenidato em um modelo genético relacionado à endofenótipos do TDAH"

Por

Jéssica Cordeiro de Oliveira Squariz

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (013/2018/PPGBCD) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



Prof.(a) Dr.(a) Geison de Souza Izídio
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:



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

Geison de Souza Izídio

Coordenador do PPG em
Biologia Celular e do Desenvolvimento
CCP/UFSC

Dr.(a) Gabriela Ferreira de Medeiros - participação por videoconferência
(Instituído Pasteur)



Dr.(a) Yara Costa Netto Múñiz (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 16 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador prof. Dr. Geison de Souza Izídio por ter me orientado neste trabalho e mesmo com tantas dificuldades ter confiado que eu seria capaz de realizá-lo.

Aos alunos do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), por todo suporte e disponibilidade em sempre ajudar quando necessário.

À veterinária do BEG, Luciana Honorato, por toda sua gentileza, calma e sensatez em compartilhar sua sabedoria inúmeras vezes quando necessitei.

Aos alunos e ex-alunos do Laboratório de Genética do Comportamento (LGC) que tive o prazer de conviver esses dois anos, em especial à doutoranda Natalli Granzotto e ao mestrando Guilherme Fadanni por toda paciência e disponibilidade em compartilhar comigo os seus conhecimentos e que além de colegas de laboratório, se tornaram grandes amigos.

A minha família, em especial, meus pais Rita de Cassia Cordeiro de Oliveira e José Osvaldo Squariz por todo apoio psicológico e financeiro e que mesmo distante se faziam presente em vários momentos, à minha irmã Gabriela Squariz que sem ela certamente não teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus amigos, os antigos da época de Guarapuava-PR por todo amor, amizade e sintonia que temos uns com os outros, mesmo hoje estando cada um em um lugar desse mundo e aos novos, que fiz nesses dois anos morando em Florianópolis-SC e que com certeza foram os melhores que poderia ter feito.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é um transtorno neurocomportamental que geralmente é diagnosticado em crianças e adolescentes e pode persistir durante a idade adulta. Foram utilizados modelos animais para o estudo do transtorno. Dentre eles, os ratos SHR (espontaneamente hipertensos) que são considerados o “padrão-ouro” e, portanto, os mais utilizados atualmente nas pesquisas do TDAH. Entretanto, os ratos SHR apresentam algumas limitações que prejudicam a sua validação como um modelo de TDAH. Assim, no presente estudo, avalia-se a perspectiva da linhagem SLA16 ser melhor para estudar alguns endofenótipos do transtorno, do que a linhagem SHR. Para isso, os ratos das linhagens SHR e SLA16 fêmeas e machos foram tratados cronicamente na adolescência, com o fármaco de primeira escolha para tratamento do TDAH (ritalina®). Após 1 ou 4 meses, os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliar endofenótipos de hiperatividade/impulsividade e memória/aprendizado. Os resultados mostraram uma maior hiperatividade locomotora na linhagem SLA16, independente do sexo ou da idade, no teste do campo aberto. A ritalina® causou melhora na discriminação dos objetos novos nas fêmeas da linhagem SLA16 no teste de reconhecimentos de objetos, após 1 mês. Após 4 meses, a ritalina® causou melhora na discriminação dos objetos novos nas fêmeas das duas linhagens. Assim, podemos concluir que a linhagem SLA16 é potencialmente interessante para estudar endofenótipos do TDAH e que as fêmeas merecem uma maior atenção em estudos futuros, visto que apresentaram melhoras significantes em aspectos relacionados ao aprendizado/memória após o tratamento com ritalina®.

Palavras-chave: Ritalina®. Hiperatividade. Aprendizado/Memória. SHR. SLA16.

ABSTRACT

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is a neurobehavioral disorder that is usually diagnosed in children and adolescents and may persist through adulthood. Animal models were used to study the disorder. Among them, SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) are considered the "gold standard" and, therefore, the most common strain used in ADHD basic research. However, SHR rats present some limitations that undermine their validation as a model of ADHD. Thus, in the present study, it evaluated the perspective of the SLA16 strain to be a better model to study some endophenotypes of the disorder than the SHR strain. For this, females and males from SHR and SLA16 strains were chronically treated in adolescence with the first choice drug for the ADHD (ritalin®). After 1 or 4 months, the animals were submitted to behavioral tests to evaluate endophenotypes of hyperactivity/impulsivity and learning/memory. The results showed greater locomotor hyperactivity in the SLA16 strain, regardless of gender, or age, in the open field test. Ritalin® improved the discrimination of new objects in SLA16 females in the object recognition test, after 1 month. After 4 months, ritalin® improved the discrimination of new objects in females of both strains. Thus, we can conclude that the SLA16 strain is potentially attractive to study endophenotypes of ADHD and that females deserve greater attention in future studies since they presented significant improvements in aspects related to learning/ memory after treatment with ritalin®

Keywords: Ritalin®. Hyperactivity. Learning/memory. SHR. SLA16.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

6-OHDA = 6-Hidroxidopamina
AE = Alteração espontânea
ANOVA = Análise de Variância
Anxrr16 = anxiety related response QTL 16 (QTL para respostas relacionadas à ansiedade 16)
APA = Associação de Psiquiatria Americana
CA = Campo Aberto
CEUA/UFSC = Comit de tica no Uso de Animais em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina
CPF = Córtex Pré-Frontal
DA = Dopamina
DAT = Transportador de Dopamina
DAT KO = Camundongos com Eliminação Gênica para o Transportador de Dopamina
DSM = Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
EPM = Erro Padrão da Mdia
EST = Estriado
LEW = Lewis
MAO = Monoamina Oxidase
MFD = Metilfenidato
NAc = Núcleo Accumbens
NHE = Ratos Naple com Alta Excitabilidade
PCBs = policlorobifenilos
QTL = Locus para Características Quantitativas
RIT = ritalina
RO = Reconhecimento de objetos
SAL = Salina 0,9%
SLA16 = SHR.Lewis/Anxrr16
SN = Substância Negra
SNC = Sistema Nervoso Central
SHR = Ratos Espontaneamente Hipertensos
TDAH = Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TH = Tirosina Hidroxilase
VMAT2 = Transportador Vesicular de Monoaminas 2
VTA = rea Tegmental Ventral
WKY = Wistar-Kyoto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado de um neurônio dopaminérgico...	16
Figura 2. Vias dopaminérgicas.....	18
Figura 3. Esquema simplificado representando o genoma das linhagens SHR, LEW e SLA16.....	24
Figura 4. Ilustração esquemática do mecanismo de ação do metilfenidato (MFD).	26
Figura 5. Aparato do Campo Aberto.....	31
Figura 6. Representação esquemática do teste de reconhecimento de objetos.....	32
Figura 7. Representação esquemática do teste de alternância espontânea realizado no labirinto em Y.	33
Figura 8. Massa corporal dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos ao longo do tratamento com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL).....	40
Figura 9. Distância total dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA.41	
Figura 10. Distância periférica dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA.	42
Figura 11. Distância no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA.	42
Figura 12. Número de entradas no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA.	43
Figura 13. Tempo no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA.....	43
Figura 14. Índice de discriminação das fêmeas SHR e SLA16. (A) Índice de discriminação no treino e (B) Índice de discriminação no teste.....	45
Figura 15. Índice de discriminação dos machos SHR e SLA16. (A) Índice de discriminação no treino e (B) Índice de discriminação no teste.....	46
Figura 16. Número de alternâncias espontâneas dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou	

veículo (SAL) no labirinto em Y	47
Figura 17. Distância total dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA.....	48
Figura 18. Distância periférica dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA.....	49
Figura 19. Distância no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA.....	49
Figura 20. Número de entradas no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA.....	50
Figura 21. Tempo no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA.....	50
Figura 22. Índice de discriminação das fêmeas SHR e SLA16, (A) Índice de discriminação no treino e (B) Índice de discriminação no teste.....	52
Figura 23. Índice de discriminação dos machos SHR e SLA16, (A) Índice de discriminação no treino e (B) Índice de discriminação no teste.....	52

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Principais modelos animais utilizados para o estudo do TDAH.....	20
Quadro 1. Resumo dos experimentos desenvolvidos neste trabalho.....	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH)	13
1.2 NEUROBIOLOGIA DO TDAH	15
1.3 MODELOS ANIMAIS	18
1.4 LINHAGEM SHR	21
1.5 LINHAGEM SLA16	22
1.6 TRATAMENTO TDAH	24
1.7 OBJETIVOS	27
1.7.1 Objetivo Geral	27
1.7.2 Objetivos Específicos.....	27
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 ANIMAIS	29
2.2 BEM-ESTAR ANIMAL	29
2.3 ADMINISTRAÇÃO DO METILFENIDATO (Ritalina®).....	29
2.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	30
2.4.1 Campo Aberto (CA)	30
2.4.2 Reconhecimento de Objetos (RO)	31
2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
2.5.1 Primeiro bloco experimental	34
2.5.2 Segundo bloco experimental	35
2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
3 RESULTADOS	39
3.1 PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL	39
3.1.1 Experimento 1 - Campo Aberto	40
3.1.2 Experimento 2 – Reconhecimento de objetos	44
3.1.3 Experimento 3 – Alternação espontânea	46
3.2 SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL	47
3.2.1 Experimento 4- Campo Aberto	47
3.2.2 Experimento 5- Reconhecimento de objetos	51
4 DISCUSSÃO	53
5 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH)

Os sintomas característicos observados no Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) foram mencionados pela primeira vez, pelo médico alemão Heinrich Hoffman através do poema “Felipe o inquieto” em 1865. Já as primeiras referências ao transtorno na literatura médica surgiram no meio do século XIX, mas só no começo do século XX, que o quadro clínico começou a ser descrito de maneira mais sistemática (PETRY, 1999). O transtorno em questão é uma das condições neuropsiquiátricas mais comuns com uma prevalência global estimada em cerca de 5% em crianças com idade escolar e 65% dos casos, os sintomas prejudiciais persistem na idade adulta (FARAONE et al., 2005). Algumas pesquisas estimam a prevalência de TDAH em 3,0-8,9% em crianças (CAYE et al., 2016; SKOGLI et al., 2013) e 3,5-12,2% em adultos (CAYE et al., 2016; MATTE et al., 2015a, RIGLER et al., 2016).

Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística de transtornos mentais - DSM-V, o início do TDAH acontece antes dos 7 anos de idade, porém evidências apontam que o período de transição entre a infância e a adolescência é a fase crucial para as primeiras manifestações clínicas do transtorno (KIELING et al., 2010). Durante a adolescência, um complexo processo de desenvolvimento biológico, psicológico e social acontece, portanto, é um período da vida caracterizado como de grande tendência a um comportamento de risco (STEINBERG, 2008). É uma fase descrita por ser de alta suscetibilidade a muitos transtornos psiquiátricos (KESSLER et al., 2005). Sendo assim, dentre os pacientes diagnosticados com TDAH, 50% apresentam os sintomas iniciais antes dos 7 anos, 95% antes dos 12 anos e 99% antes dos 16 anos (KESSLER et al., 2005).

Há três subtipos clássicos de apresentação clínica do TDAH: o predominantemente impulsivo/hiperativo, o predominantemente desatento e o quadro combinado (DSM V, 2013). Relatos apontaram que a hiperatividade desaparece com o passar do tempo, persistindo somente os sintomas relacionados à atenção deficiente (SWANSON et al., 1998) e a maior parte das pessoas que possuem o transtorno é do sexo masculino em relação ao sexo feminino (KESSLER et al., 2006; WILLIAMSON & JOHNSTON, 2015).

Segundo o Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria

(APA, 2013) e o (DSM-V, 2013) os pacientes que apresentam o transtorno devem possuir, no mínimo, seis ou mais sintomas de desatenção, como por exemplo, não manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas, falta de persistência, dificuldade em manter o foco, não ouvir quando se fala etc. O mesmo acontece com a hiperatividade que se refere à atividade motora excessiva como falar excessivamente, remexer as mãos ou pés etc. E ainda, ações impulsivas que ocorrem sem premeditação como atravessar uma rua sem olhar. Os sintomas devem ser exibidos em mais de um ambiente (acadêmico, social e ocupacional) e a ocorrência deles deve permanecer por pelo menos seis meses (AUSTERMAN, 2015; RIGLER et al., 2016).

Apesar dos sintomas característicos, o TDAH é amplamente heterogêneo e está correlacionado a um grande número de deficiências diferentes, abrangendo déficits comportamentais e cognitivos (TOSTO et al., 2015). O TDAH com a presença de algumas comorbidades, como transtorno de humor, o uso de substâncias e transtorno de ansiedade, está presente em 20–30%, 12–24% e 10–49% dos pacientes, respectivamente. Já os transtornos de ansiedade têm um índice maior (entre 10% e 49%) e os medicamentos prescritos são distintos daqueles destinados aos pacientes com TDAH com comorbidades separadas (AUSTERMAN, 2015).

Classificado como um distúrbio multifatorial e altamente herdável, estudos com gêmeos estimam uma hereditariedade média de 76% (FARAONE et al., 2005). Contudo, a prevalência do TDAH não pode ser explicada apenas pela genética, muitos fatores ambientais foram identificados como potenciais fatores de risco para o desenvolvimento do transtorno, envolvendo a exposição pré-natal ao álcool, fumaça de cigarro e poluentes ambientais como chumbo e policlorobifenilos (PCBs) (BANERJEE et al., 2007; SAGVOLDEN & SERGEANT, 1998). O transtorno também está relacionado à exposição pré-natal à nicotina (MILBERGER et al., 1998; MICK et al., 2002; THAPAR et al., 2003), conforme estudos que mostram que crianças cujas mães fumaram durante a gravidez, apresentaram uma maior incidência de TDAH que os seus controles (NEUMAN et al., 2007; SCHMITZ et al., 2006).

Em relação ao seu diagnóstico, é realizado com base nos níveis disfuncionais persistentes de atenção, impulsividade e hiperatividade, porém, até o presente momento, não há marcadores biológicos conhecidos ou testes laboratoriais que podem comprovar esse diagnóstico. Dessa maneira, a identificação do transtorno é realizada, principalmente, através da observação de características

comportamentais (TRIPP et al., 2009). Mesmo existindo muitos estudos acerca do TDAH, as causas precisas do transtorno ainda não são bem estabelecidas. Porém, os fatores genéticos e ambientais exercem uma grande influência no transtorno e são amplamente aceitos na literatura (TANNOCK, 1998; THAPAR et al., 1999).

1.2 NEUROBIOLOGIA DO TDAH

Os genes implicados no TDAH não estão muito bem esclarecidos, apesar das altas estimativas de herdabilidade (NEALE et al., 2010). Estudos genéticos e moleculares testaram uma variedade de genes candidatos que podem estar correlacionados ao desenvolvimento desses transtornos e concluíram que uma grande quantidade desses genes influencia a disponibilidade de dopamina no córtex pré-frontal. Essa abordagem possui um forte embasamento teórico já que a neurotransmissão da dopamina está associada à sintomatologia do TDAH que inclui a memória de trabalho, inibição da resposta e atenção; características que são observadas em modelos humanos e não humanos (WILLCUTT et al., 2005; NIGG, 2005).

A hipótese mais aceita para explicar sua neurobiologia é de que existam alterações cerebrais no sistema monoaminérgico. Evidências clínicas mostram que inibidores da recaptação de dopamina, como, por exemplo, a anfetamina ou metilfenidato (Ritalina®) e inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina, como os antidepressivos tricíclicos, provocam uma melhora nos sintomas das pessoas que possuem o transtorno (BIEDERMAN & SPENCER, 1999; SEEMAN & MADRAS, 1998). Ou seja, o TDAH

é causado por uma hipofunção dopaminérgica nas regiões corticais, límbicas e motoras do sistema nervoso central (FARAONE & BIEDERMAN, 2005). Sendo assim, as áreas mais relevantes do cérebro ligadas à sintomatologia do TDAH são o Estriado (EST) e o Córtex Pré-Frontal (CPF) (HIMELSTEIN, NEWCORN et al., 2000). Além disso, observa-se em pacientes que possuem TDAH, um aumento da atividade dos transportadores de dopamina (DAT) (KRAUSE, DRESEL et al., 2003) e da Monoamino Oxidase (MAO), enzima responsável pela metabolização da Dopamina (DA) (STOFF, FRIEDMAN et al., 1989), tais observações colaboram para a hipótese de uma hipofunção no sistema dopaminérgico. Dougherty, Bonab e colaboradores (1999) apontaram para um aumento de aproximadamente 70% na atividade do DAT em adultos com TDAH, conforme mostra a Figura 1.

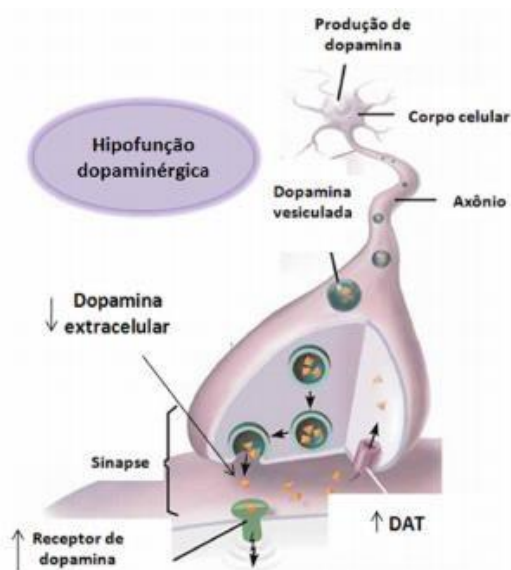


Figura 1. Esquema simplificado de um neurônio dopaminérgico com diminuição de dopamina extracelular e aumento da atividade dos transportadores de dopamina no TDAH. Shen Hang, 2016.

São encontradas três vias dopaminérgicas principais no cérebro: a mesolímbica, mesocortical e nigrostriatal (FIORILLO et al., 2003; SCHULTZ, 1998). O EST e CPF constituem o circuito corticoestriatal que é formado por neurônios dopaminérgicos que conectam essas duas regiões. Os corpos celulares desses neurônios estão localizados na Área Tegmental Ventral (VTA) e emitem projeções para diferentes regiões do EST (via mesolímbica e mesoestriatal) ou do CPF (via mesocortical). Na via mesolímbica, encontram-se os neurônios dopaminérgicos que projetam-separa o Núcleo Accumbens (NAc). Já para formar a via mesocorticolímbica, os neurônios estendem-se ao CPF que é conhecido como sistema de recompensa, visto que está ligado à motivação e às respostas gratificantes de drogas de abuso ou de reforçadores naturais como, por exemplo, alimentos, interação social e sexo (FIBIGER & PHILLIPS, 1988; BRESSAN & CRIPPA, 2005; CARLEZON & THOMAS, 2009).

A DA na via mesocortical, possui uma grande relevância na organização nos níveis mais importantes da cognição relacionadas às habilidades como atenção, memória, planejamento e flexibilidade

comportamental (FLORESCO & MAGYAR, 2006). A via nigroestriatal é caracterizada como sendo uma via dopaminérgica originada na Área Tegmental Ventral (VTA), que possui neurônios de DA, onde os corpos celulares estão localizados na parte compacta da Substância Negra (SNc) e são projetados para regiões do EST. A via nigroestriatal também é responsável pelos sintomas observados em indivíduos com TDAH (ROMANOS, WEISE et al., 2010). Além disso, as teorias neurobiológicas do TDAH também estão relacionadas às disfunções em estruturas neuronais incluindo a substância negra, o hipotálamo e o cerebelo (VALERA et al., 2007). Considerada como uma importante parte do encéfalo, o cerebelo também mostra importantes alterações em pessoas que possuem o TDAH e tais mudanças podem ser vistas em outros distúrbios neuropsiquiátricos, como a esquizofrenia, depressão e transtorno bipolar (IVANOV et al., 2014; VILLANUEVA, 2012).

A funcionalidade e a importância do cerebelo para a função motora, como os movimentos voluntários coordenados estão bem elucidadas (FINE et al., 2002). A literatura com estudos neuroanatômicos e com a neuroimagem aponta mais evidências para o envolvimento do cerebelo em funções não motoras, relacionando uma grande variedade de processos linguísticos, afetivos e cognitivos (DE SMET et al., 2013) e desempenhando papéis importantes em uma variedade de processos mentais, como aprendizagem, emoção, atenção e memória (GOLLA et al., 2005; IVRY et al., 2002; SCHMAHMANN & SHERMAN, 1998; STEINLIN, 2008; STOODLEY et al., 2012).

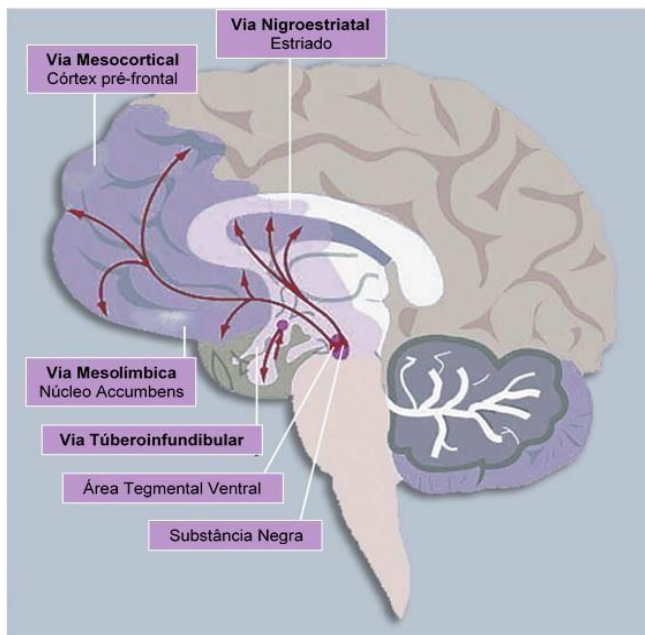


Figura 2. Vias dopaminérgicas relevantes no TDAH. Ernst & Luciana, 2015; adaptado de Granzotto, 2016.

1.3 MODELOS ANIMAIS

Apesar dos modelos animais não poderem, efetivamente, elucidar os transtornos psiquiátricos humanos, eles oferecem uma compreensão sobre a desordem que não pode ser alcançada a partir de estudos com humanos devido às suas limitações técnicas ou éticas (RUSSEL, 2001). O estado emocional do animal é um conceito que envolve componentes subjetivos. Assim, os pesquisadores tendem a inferir o seu estado emocional a partir de manifestações que possam ser medidas, tais como suas respostas comportamentais e fisiológicas (RAMOS; MORMÈDE, 1998).

Utilizar roedores como modelo animal em pesquisas possui algumas vantagens, dentre as quais: são geneticamente bastante homogêneos, a sua manutenção é mais simples, possui disponibilidade de um maior número de animais experimentais para serem utilizados e a sua neurobiologia vem sendo estudada cada vez mais além do pesquisador ter melhor controle sobre algumas variáveis como dieta,

meio ambiente e histórico de aprendizado.

Os roedores possuem ainda, sistema nervoso e seus mecanismos comportamentais básicos semelhantes aos dos humanos (RUSSELL et al., 2005) e são utilizados para investigar os efeitos das terapias disponíveis para produzir novas opções terapêuticas. Sendo assim, estes modelos são de grande importância, pois proporcionam situações padronizadas e controladas de experimentação, ao contrário do que é observado em estudos com seres humanos (JACOB, 2010). Quando comparados a controles adequados, fornecem informações importantes desde a neuroquímica subjacente até aspectos específicos do comportamento do TDAH.

Ressalta-se que as diferenças entre o comportamento de um modelo animal e seu controle podem ser correlacionadas com diferenças em sua farmacologia, neuroquímica e comportamento (RUSSELL et al., 2005).

Sarter et al. (1992) criaram critérios para validar modelos de transtornos humanos. E em 2000, Sagvolden propôs critérios para avaliar modelos para TDAH. Para um animal ser validado para o estudo do TDAH, há três critérios principais (DAVIDS et al., 2003; SAGVOLDEN et al., 2005). A validação preditiva diz respeito à resposta do modelo aos fármacos usados na clínica para tratamento do TDAH. A validação de face ou analogia está relacionada com os endofenótipos de impulsividade, desatenção e hiperatividade. Por fim, a validação de construto ou de homologia compreende predisposições genéticas, disfunções neuroestruturais e funcionais compatíveis com o TDAH, disfunções nas vias dopaminérgicas e em outras vias monoaminérgicas (SAGVOLDEN et al., 2005). É importante mencionar que os modelos animais utilizados em pesquisas, também apresentam limitações, pois os transtornos psiquiátricos humanos estão relacionados com fatores bastante subjetivos. Com isso não se pode afirmar que um animal exibe ou não algum transtorno, o que podemos fazer é correlacionar os comportamentos observados associando com sintomatologia vista no transtorno humano. Assim, os modelos disponíveis hoje são muito úteis nas abordagens a qual se determinam.

Atualmente existem vários modelos animais de TDAH, mas poucos destes foram desenvolvidos especificamente com o intuito de modelar a base genética multifatorial do TDAH (MAJDAK et al., 2016). Analisando esses modelos consegue-se observar vantagens e desvantagens e, cada um deles é capaz de simular uma ou outra característica do TDAH. Contudo, a linhagem de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) cumpre a maioria dos critérios de

validação listados acima e se compara bem com os casos clínicos do transtorno (RUSSEL, 2006; SAGVOLDEN, 2000).

Os ratos SHR foram os mais bem caracterizados e atualmente, são o modelo mais adequado e utilizado de TDAH (RUSSEL, 2006). A Tabela 1 mostra vários modelos sugeridos para o TDAH, analisados quanto aos três critérios de validação. Os modelos mais estudados, além dos SHR, compreendem os ratos neonatos lesionados com 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e alguns dos principais modelos genéticos: Ratos Naple com Alta Excitabilidade (NHE) e Camundongos com Eliminação Gênica do Transportador de Dopamina (DAT KO).

	ANALOGIA			HOMOLOGIA		PREDITIVO
	Hiperatividade	Desatenção	Impulsividade	DAT	D4	Metilfenidado
Lesãoneonatal com6-OHDA	Sim	Sim	-	-	Sim	Sim
Modelo da hipóxia neonata	Sim	-	-	Não	-	-
Modelo BrdU-neonatal	Sim	-	-	-	-	Não
Stunting cerebelar	Sim	-	-	-	-	Não
Irradiação cerebelar	Sim	Sim	-	-	-	-
SHR	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Ratos WKHA	Sim	Sim	Sim	-	-	Não
Ratos NHE	Sim	Sim	-	Sim	-	-
Camundongos running	Sim	-	-	-	-	Sim
Camundongos coloboma	Sim	-	-	-	-	Não
Camundongos acallosal	Sim	Sim	-	-	-	-
Camundongos DAT KO	Sim	-	Sim	Sim	-	Sim
Camundongos DAT KD	Sim	-	Sim	Sim	-	-
Mutações na tireóide	Sim	Sim	Sim	-	-	Não
Rato hipoesexual	Sim	Sim	-	-	-	-

Tabela 1. Modelos animais propostos para o estudo do TDAH. Adaptado de Pandolfo, 2010.

1.4 LINHAGEM SHR

Os ratos da linhagem SHR foram selecionados, pelos pesquisadores japoneses Okamoto e Aoki em 1963, a partir de animais da linhagem Wistar que espontaneamente mostravam uma alta pressão sanguínea, e assim foram cruzados por sucessivas gerações. Esta seleção artificial resultou em uma linhagem isogênica de ratos, que apresentam hipertensão arterial sistêmica de forma espontânea (BEIERWALTES, ARENDSHORST & KLEMER, 1982). As suas características neurobiológicas e comportamentais são equivalentes às analisadas em pessoas que possuem o TDAH, como uma hipofunção do sistema dopaminérgico e a tríade de sintomas (desatenção, impulsividade e hiperatividade) (WULTZ, SAGVOLDEN et al., 1990; SAGVOLDEN, METZGERS et al., 1992; KANTAK et al., 2008).

No teste do campo aberto, que é um teste classificado para medir ansiedade/emocionalidade e utilizado também para mensurar parâmetros locomotores em roedores, a linhagem de ratos SHR mostrou ser mais hiperativa do que os seus controles, os ratos WKY. Além disso, os ratos SHR foram sensíveis aos receptores de dopamina e alfa2 e receptores adrenérgicos (ROMMELSE et al., 2009). Em relação aos tratamentos farmacológicos, dados clínicos encontrados na literatura mostraram que os inibidores da recaptação de dopamina utilizados para o tratamento dos sintomas, como o metilfenidato (MFD) (BRITTON & BETHANCOURT, 2009) ou anfetaminas (HEAL et al., 2013) possam melhorar a sintomatologia do TDAH.

A linhagem também mostra déficits de aprendizado e memória, apesar de não ser prejudicada em tarefas de atenção sustentada (BARI; ROBBINS, 2011). Prejuízos no sistema fronto-estriatal, como na liberação de dopamina no córtex pré-frontal, núcleo accumbens e núcleo caudado são observados nos ratos SHR. Além disso, a baixa expressão dos receptores D4, que já foi observada em estudos com pacientes que apresentam TDAH, também pode ser vista nos ratos SHR e já foi mencionado em pesquisas com o sistema dopaminérgico que os ratos SHR mostram concentrações elevadas de noradrenalina no locus coeruleus, substância negra e córtex pré-frontal (SONTAG et al., 2010).

Limitações também são encontradas na linhagem SHR, como podem ser vistas em qualquer outro modelo animal. Uma delas está relacionada ao aparecimento da hipertensão. Não se pode afirmar, com certeza, se os prejuízos neurocognitivos são consequências da hipertensão. Salientando que o aparecimento da pressão arterial elevada nessa linhagem começa na 5ª semana de vida. Entre a 7ª e a 15ª semana,

os animais possuem níveis de pressão arterial considerada como hipertensão arterial espontânea (YAMORI, 1984 apud FAZAN, R; DA SILVA, SALGADO, H. C, 2001).

Além disso, a linhagem SHR desenvolve hipertrofia do coração e de vasos sanguíneos que são características de doença cardiovascular (CONRAD, 1995). Assim, se os fármacos psicoestimulantes prescritos para o TDAH forem utilizados, como o MFD, pode ocorrer prejuízos cardiovasculares nos ratos SHR, prejudicando a sua utilização como modelo de TDAH (WINTERSTEIN et al., 2009). Outro aspecto relevante é o distúrbio do metabolismo do cálcio, uma redução no transporte ativo de cálcio pelo intestino (SHIBATA et al., 1990) e o que ocasiona a perda do excesso através da urina (HSU et al., 1987) que pode gerar uma hipocalcemia e também prejudicar a sinalização intra e intercelular, bem como a LTP, um análogo neuronal da aprendizagem (SAGVOLDEN, 2005; MALENKA, 1999). Sagvolden, Johansen e colegas (2009) alertam a necessidade da escolha apropriada da linhagem comparativa para estudar as características do TDAH, sendo que sublinhagens de SHR podem apresentar comportamentos diferentes e ainda indicam que o modelo mais confiável para estudar o subtipo combinado de TDAH é a linhagem SHR/NCrl proveniente da empresa Charles River–Alemanha.

1.5 LINHAGEM SLA16

A linhagem congênica SLA16 (SHR.Lewis/Anxrr16) foi desenvolvida no laboratório de genética do comportamento da Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC, mais especificadamente no Laboratório de Genética do Comportamento-LGC. A construção da linhagem SLA16, de maneira sucinta, foi realizada por sucessivos retrocruzamentos entre as linhagens SHR (receptora) e Lewis (doadora), culminando em uma linhagem com um genoma inteiro da linhagem SHR, com exceção do locus de interesse oriundo da linhagem Lewis conforme Figura 3 (DE MEDEIROS et al., 2013).

A origem dessa linhagem teve como objetivo a investigação do locus Anxrr16 (do inglês Anxiety related response) sobre comportamentos relacionados à emocionalidade, principalmente comportamentos “tipo ansioso”. Esse locus foi identificado por Ramos e colaboradores em 1999, em sua busca por loci que influenciassem características quantitativas, também chamada de análise de QTL (Quantitative Trait Loci). O Anxrr16 parece influenciar, especialmente, a locomoção no centro do CA, que em roedores é considerado um índice

clássico de emocionalidade (RAMOS et al., 1999; MORMÉDE et al., 2002).

A linhagem SLA16 diferencia-se em alguns aspectos da linhagem SHR e apresenta evidências de ser a mais adequada para o estudo de alguns endofenótipos do TDAH. Por exemplo, principalmente em relação aos parâmetros locomotores, quando existe um fator de novidade, os ratos SLA16 apresentam hiperatividade locomotora em relação aos ratos SHR (DE MEDEIROS et al., 2013; ANSEMI et al., 2016). Esse interesse por novidade é denominado neofilia que é uma característica bastante exibida em humanos diagnosticados com TDAH, principalmente com o subtipo impulsivo/hiperativo (PARK et al., 2016). Donfrancesco e colaboradores (2015) afirmam que a busca por novidades deve ser vista em um dos sintomas principais do TDAH.

As concentrações de DAT e D2 no hipocampo dos SLA16 aparentam similaridade quanto às da linhagem SHR (PÉRTILE et al., 2017), sugerindo que a linhagem SLA16 também apresente uma hipofunção dopaminérgica, característica do TDAH. Além disso, os ratos SLA16 parecem apresentar menor pressão arterial do que os SHR (CORRÊA, 2015). Quanto à memória de trabalho, os SLA16 parecem ser similares aos SHR (GRANZOTTO, 2016).

Essas características, observadas na linhagem SLA16, podem ser úteis na compreensão de aspectos relacionados ao TDAH. A linhagem SLA16, por se destacar em alguns pontos específicos e quando comparada à linhagem SHR, poderia ser considerada um melhor modelo genético para o estudo de endofenótipos do TDAH. Desse modo, a primeira hipótese deste estudo é que a linhagem SLA16 seja um modelo genético mais adequado para estudar endofenótipos relacionados ao TDAH, do que a linhagem SHR.

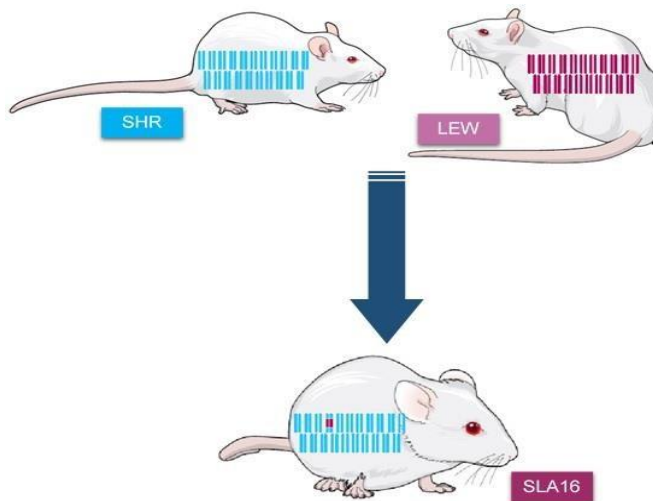


Figura 3. Esquema simplificado representando o genoma das linhagens SHR, LEW e SLA16. Nos animais SLA16, todo o genoma (em azul) é derivado da linhagem SHR, exceto uma porção do cromossomo 4 (em vermelho) que é derivado da linhagem LEW. Adaptado de Granzotto, 2016.

Os psicoestimulantes são a classe de drogas mais utilizadas para o tratamento que busca atenuar os sintomas comportamentais do TDAH (desatenção, impulsividade e hiperatividade) (CHILDRESS & TRAN, 2016; BACHMANN et al., 2017; DE CRESCENZO et al., 2017). Por exemplo, o MFD é um bloqueador do transportador de dopamina (DAT), conforme pode ser observado na figura 4. Ele é considerado o fármaco mais receitado do mundo para o transtorno (GOLDMAN et al., 1998; ROBISON et al., 1999; CDC, 2007). Especificamente, o MFD bloqueia tanto os transportadores de dopamina, quanto os de noradrenalina e seus efeitos no circuito fronto-estriatal têm sido associados a alterações na transmissão desses neurotransmissores (ROESSNER et al., 2010).

Esta droga tem a capacidade de aumentar a inibição da resposta ou seja a diminuição da impulsividade, que é uma das característica observada em crianças e adolescentes que possuem TDAH (RHODES et al., 2006; COGHILL et al., 2007). Os efeitos terapêuticos do MFD são resultantes, ao menos em parte, do aumento da dopamina extracelular

(DA) no córtex pré-frontal (BERRIDGE et al., 2006; BERRIDGE EDEVILBISS, 2011). De maneira aguda, o MFD tem efeitos psicoestimulantes. Já os efeitos crônicos do tratamento efetivamente melhoram os sintomas por uma modulação um tanto quanto paradoxal do sistema. Estudos encontrados utilizando anfetamina mostram que do mesmo modo, parece levar a uma melhora dos sintomas comportamentais, quando usada de maneira crônica (SEEMAN & MADRAS, 1998).

Quando utilizado em animais, por exemplo, ratos SHR tratados cronicamente, durante a adolescência, mostram diminuição da hiperatividade (atividade horizontal e estereotipia) durante a idade adulta, observado como uma diminuição da locomoção durante o teste de campo aberto (SOMKUWAR et al., 2016). O uso em longo prazo em ratos consanguíneos mostra que doses baixas, durante a adolescência, minimizam a escolha impulsiva durante a idade adulta, de modo que recompensas mais demoradas são escolhidas em relação às recompensas menores imediatas (ADRIANI, CANESE et al., 2007). Do mesmo modo, em longo prazo, uma baixa dose de MFD durante adolescência, está relacionada com uma boa aprendizagem e um aumento da expressão do RNAm do receptor D3 na idade adulta. Em geral, alguns resultados mostram que o MFD pode ter efeito imediato e duradouro sobre o desempenho cognitivo dependente do córtex orbito-frontal e da função dopaminérgica em roedores, embora os seus efeitos relacionados à taxa de aprendizagem, possam variar dependendo da complexidade da tarefa e da dosagem da administração (AMODEO et al., 2017).

Além dos seus efeitos terapêuticos esta droga é amplamente utilizado para o uso não médico entre adolescentes visando uma melhora nos seus efeitos cognitivos. Aliás, alguns estudos na literatura mostram que os efeitos da droga vão depender do estágio de desenvolvimento em que ocorre a exposição ao medicamento sendo a adolescência definida um período de alta vulnerabilidade, já que é durante esse período da vida que os humanos e animais não humanos mostram um amadurecimento crucial das regiões cerebrais associadas à impulsividade. O córtex pré-frontal, por exemplo, e suas conexões dopaminérgicas ainda estão em desenvolvimento e é durante esta fase, que os ratos estão sujeitos a perturbações (REYNOLDS et al., 2015; CABALLERO et al., 2016). Além disso, o uso crônico do metilfenidato mostra alterações no peso corporal, consumo de alimentos, atividade locomotora, medidas de exploração e ansiedade (ROBISON et al., 2017) e o peso corporal reduzido pode estar relacionado aos efeitos metabólicos do estimulante (ERSCHE et al., 2013).

Em resumo, o tratamento com MFD em roedores resulta em alterações na neurobiologia e em vários tipos de comportamento como: locomoção, comportamentos emocionais, cognição, memória e respostas a recompensas naturais e de drogas (WULTZ et al., 1990; MUELLER, 1993; GAYTAN et al., 1996,2000; IZENWASSER et al., 1999, BRANDON et al., 2001, HEYSER et al., 2004, ARNSTEN E DUDLEY, 2005; MAGUE et al., 2005, BERRIDGE et al., 2006; CHUHAN E TAUKULIS, 2006; GRAY et al., 2007, THANOS et al., 2007, ZHU et al., 2010).

Então, como segunda hipótese experimental, acreditamos que o tratamento crônico com ritalina® atenua os comportamentos relacionados ao TDAH na idade adulta das linhagens de ratos SHR e SLA16.

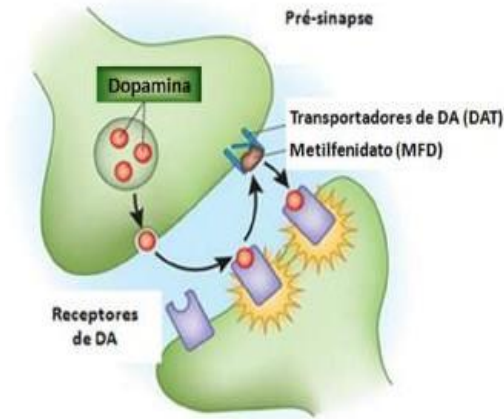


Figura 4. Ilustração esquemática do mecanismo de ação do metilfenidato (MFD), quando utilizado de maneira aguda. Adaptado de Bush (2010).

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Comparar as linhagens de ratos SHR e SLA16 em relação a endofenótipos do TDAH, após tratamento com Ritalina®.

1.7.2 Objetivos Específicos

- Analisar diferenças da massa corporal das linhagens SHR e SLA16 ao longo do tratamento crônico com ritalina®;
- Comparar a atividade locomotora e o aprendizado/memória dos animais das linhagens SHR e SLA16 fêmeas e machos na idade adulta, após tratamento crônico com ritalina® durante a adolescência (Primeiro bloco experimental);
- Investigar os efeitos da ritalina®, à longo prazo, nos animais das linhagens SHR e SLA16 fêmeas e machos, após a descontinuidade do tratamento (Segundo bloco experimental).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Ratos machos e fêmeas das linhagens isogênicas SHR (Spontaneously Hypertensive Rats- SHR/NCrl) e SLA16 (SHR.LEW-Anxrr16) foram criados no biotério do Laboratório de Genética do Comportamento da UFSC localizado em Florianópolis-SC, a linhagem SHR é originária da Universidade de Harvard (Boston, MA, USA), obtida a partir da UNESP (Campinas, SP, Brasil) e a linhagem SLA16 foi gerada no biotério setorial do mesmo laboratório (PEREIRA, 2010). Os animais foram desmamados com 28 dias de vida, separados por sexo e alojados de 5 a 6 por gaiola (41 cm x 34 cm x 16 cm de altura) com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclos claro/escuro de 12 em 12h (luzes ligadas das 7:00 às 19:00h) com acesso à água e comida ad libitum.

2.2 BEM-ESTAR ANIMAL

Este estudo utilizou um tratamento crônico com um psicoestimulante em um período que compreende a adolescência de ratos, assim, é de grande importância o acompanhamento do bem-estar animal ao longo dos 16 dias de tratamento com a droga. Periodicamente, os ratos foram monitorados acerca de sua sobrevivência, avaliando a perda e ganho de massa corporal e normalidade de comportamento na caixa-moradia. O ponto final humanitário determinado foi a redução aguda de 25% da massa corporal inicial observada no início do tratamento. A taxa de perda/exclusão de animais total foi de 4 animais. Todos os procedimentos de manuseio animal foram realizados de acordo com as diretrizes nacionais e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC), conforme protocolo PP00903. O trabalho foi executado sob ciência das diretrizes do Centro Nacional para a Substituição, Refinamento e Redução de Animais na Pesquisa (NC3Rs) propostas pelo guia ARRIVE (KILKENNY et al., 2010), que tem como objetivo melhorar a qualidade das pesquisas biomedical

2.3 ADMINISTRAÇÃO DO METILFENIDATO (Ritalina®)

O MFD (Ritalina®, Novartis) foi adquirido na forma de comprimido e antes da utilização foi macerado e dissolvido em salina (NaCl a 0,9%), utilizada como controle. No primeiro bloco

experimental, os animais foram tratados, logo após o desmame, do 28º até 44º dia. Os filhotes machos e fêmeas foram pesados durante todo o tratamento e receberam a dose de 2 mg/kg da droga ou solução salina por via oral (gavagem) duas vezes ao dia, por 16 dias consecutivos. O protocolo mencionado, com poucas modificações, foi utilizado por Vendrusculo e colaboradores em 2008. A literatura mostra que a dose de 2,0 mg/kg de ritalina® possui grande relevância na clínica e foi previamente demonstrada em atingir os níveis plasmáticos máximos dentro do intervalo terapêutico em humanos (BALCIOGLU et al., 2009; GERASIMOV et al., 2000). Estudos anteriores com ratos jovens, em tratamento crônico com metilfenidato, mostraram respostas comportamentais aos estímulos emocionais após o término do tratamento (BOLAÑOS et al., 2003), além de alterar níveis de proteínas mediadoras da neuroplasticidade (QUANSAH et al., 2017b).

2.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

2.4.1 Campo Aberto (CA)

Calvin Hall (1934) descreveu o CA com o objetivo de avaliar a emocionalidade em ratos, desde então ele é um dos testes de ansiedade mais utilizados. Ademais, é um teste clássico para avaliar a ansiedade e também é utilizado para analisar a atividade locomotora (PRUT & BELZUNG, 2003). O aparato (Figura 5) é constituído de uma arena que mede 1m² com paredes de 40cm de altura. A área dos 90cm² centrais é considerada a região central e a área restante, adjacente às paredes, é uma área periférica. No protocolo padrão, cada animal foi posicionado no centro do campo aberto e a sua exploração no aparato foi registrada por uma câmera de vídeo durante 5 minutos. A locomoção na área central do aparato relaciona-se mais com a emocionalidade do animal, enquanto a locomoção periférica compreende, principalmente, o componente motor (RAMOS, 2008).

O aparato foi limpo, entre um animal e outro com álcool 10%. O experimento foi conduzido sob uma intensidade de luz de 12 lux, medido no centro do aparato. As medidas analisadas foram: distância total, distância periférica, distância no centro, tempo no centro e número de entradas no centro, para avaliar tais parâmetros foi utilizado o software ANY-maze® (Stoelting Co.USA).



Figura 5. Aparato do Campo Aberto

2.4.2 Reconhecimento de Objetos (RO)

O teste de Reconhecimento de Objetos (RO) analisa memórias declarativas episódicas e a sua base é principalmente o comportamento exploratório inato de roedores. Este teste exhibe vantagens em relação a outros da mesma natureza, visto que não precisa de motivação externa, recompensa ou punição (ANTUNES; BIALA, 2012). O protocolo é composto por uma sessão de treino e uma de teste. Nas vinte e quatro horas que antecedem o teste, é realizada a habituação dos animais ao aparato utilizado que consistiu de uma arena acrílica transparente (medidas aproximadas: 50 cm de largura, 50 cm de comprimento e 50 cm de altura) externamente forrada em material cinza completamente opaco. Segundo Bevins e Besheer (2006) para o teste de reconhecimento de objetos, é importante a não utilização de um aparato muito grande, já que ambientes maiores podem levar uma exploração maior do animal ao ambiente e não aos objetos expostos no teste.

Os animais são individualmente colocados no centro do aparato com duas cópias idênticas de um dos objetos (sessão de treino), em lados opostos, afastados 10 cm das paredes. Trinta minutos depois, cada animal é colocado novamente ao aparato com uma cópia do objeto familiar (objeto idêntico ao treino) e uma cópia do objeto novo (igual na sessão de teste). O tempo de exploração do objeto novo (T_n) e do objeto familiar (T_f) é determinado na sessão de teste. O tempo gasto em cada objeto é calculado a partir do índice de discriminação (DI) – $DI = (T_n -$

Tf)/(Tn+Tf). O resultado pode apresentar variações de +1 a -1, onde o resultado positivo mostra mais tempo gasto com o Tn e o resultado negativo indica mais tempo gasto com o Tf e o resultado zero, nenhuma preferência (AGGLETON et al., 2010; BURKE et al., 2010). Estudos anteriores mostram que os ratos geralmente gastam mais tempo investigando um objeto novo do que aqueles que já foram exibidos anteriormente (DODART et al., 1997; OBINU et al., 2002).

Os objetos utilizados na sessão de treino foram duas garrafas plásticas pequenas de mesma cor, tamanho e textura, e na sessão de teste uma lata metálica cilíndrica de altura e diâmetro semelhante à garrafa e forrada externamente com fita adesiva da mesma cor do aparato. Os objetos familiares possuíam 17 cm de altura e 3-5 cm de diâmetro (variável ao longo do objeto), e o objeto não-familiar possuía 13,5 cm de altura e 5 cm de diâmetro. O tempo de exploração dos objetos mostra se o animal conseguiu aprender a diferença dos objetos durante a sessão de teste e a sessão de treino. O aparato foi limpo com álcool 10%, entre os intervalos de cada animal, o experimento foi conduzido sob uma intensidade de luz de 12 lux e o comportamento de cada rato foi gravado por meio de uma câmera de vídeo.

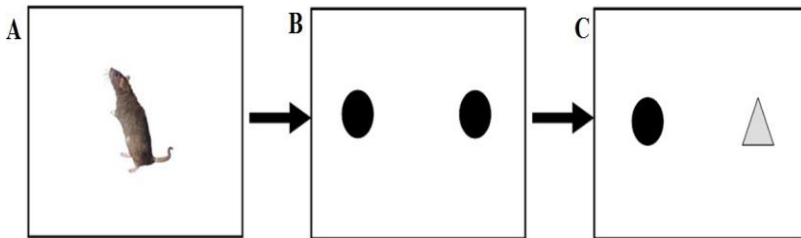


Figura 6. Representação esquemática do teste de reconhecimento de objetos. Onde, A- Habituação, B-Sessão de treino e C-Sessão de teste. Círculos: representam objetos iguais e triângulo: objeto diferente. Adaptado de Redrobe, Bull & Nielss, 2010.

2.4.3 Alteração Espontânea (AE)

O comportamento de alternância espontânea é definido pela tendência de ratos, camundongos e outros animais em alternar suas escolhas utilizando um labirinto em T ou Y com várias oportunidades sucessivas, tal teste foi descrito pela primeira vez há quase oitenta anos (TOLMAN, 1925). Dois tipos de procedimentos de alternância

espontânea já foram descritos para medir memória em animais, o paradigma original de dois ensaios e agora mais comumente, contínuo ou de alternância livre. Em ambos os casos, a maioria das investigações trabalharam na suposição de que o CAE reflete a memória de trabalho espacial ou memória de curto prazo (HUGHES, 2004).

O labirinto consiste em 3 braços idênticos ($15 \times 3 \times 5$) feitos de acrílico. No início de cada tentativa, um rato foi colocado no centro do labirinto e permitido explorar livremente durante 5 minutos. A sequência em que o rato entrou nos braços do labirinto foi gravada por câmera de vídeo, registrando as entradas nos braços. Uma entrada de braço foi definida como a entrada de todas as quatro patas no braço e uma alternância foi definida como entrada consecutiva em todos os três braços (sem revisitar um braço). A porcentagem de alternância espontânea foi calculada a partir da fórmula $\# \text{ alt}/\text{total}$ do número de entradas- 2×100 . O número total de entradas de braço também foi registrado. O aparato foi limpo com álcool 10%, entre os intervalos de cada animal, o experimento foi conduzido sob uma intensidade de luz de 12 lux.

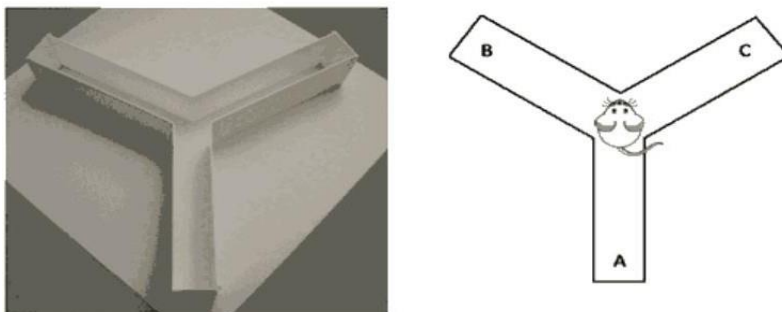


Figura 7. Representação esquemática do teste de alternância espontânea realizado no labirinto em Y.

2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho é constituído de cinco experimentos comportamentais divididos em dois blocos experimentais, cada um dos experimentos comportamentais está descrito a seguir. Na tabela 2 encontram-se resumidamente todos os experimentos.

2.5.1 Primeiro bloco experimental

No primeiro bloco experimental, foram realizadas medições da massa corporal ao longo do tratamento crônico (3 em 3 dias) com duração de 16 dias. Em relação aos testes comportamentais, os animais foram expostos na idade adulta (2 meses de idade) ao campo aberto (CA), reconhecimento de objetos (RO) e alternância espontânea (CAE), 1 mês após o fim do tratamento crônico com MFD (ritalina®). Foram utilizados 24 animais SHR (12 fêmeas e 12 machos) e 24 SLA16 (12 fêmeas e 12 machos). Foram realizados três experimentos comportamentais diferentes (experimentos 1 à 3) que ocorreram entre às 09:00 às 18:00h.

Experimento 1: Avaliou-se o perfil comportamental de fêmeas e machos das linhagens SHR e SLA16, mais especificamente os seus parâmetros locomotores na idade adulta no teste do CA, após o tratamento crônico com ritalina® na adolescência. Na ocasião, o animal foi exposto ao aparato e o seu comportamento foi gravado por 5 minutos e analisado posteriormente.

Experimento 2: Foi analisada a memória de curta duração de fêmeas e machos das linhagens SHR e SLA16 no teste de RO após o tratamento crônico com ritalina® na adolescência. O experimento consistiu em três fases: a 1ª fase foi constituída pela habituação dos animais em um ambiente novo por 10 minutos. Após 24 horas, realizou-se a 2ª fase denominada treino ou familiarização, onde os animais foram colocados no aparato com dois objetos iguais para ser explorado, livremente, por 3 minutos. Após 30 minutos, ocorreu a 3ª fase chamada de teste, onde um dos objetos foi alterado por um objeto novo e os animais puderam explorar os objetos por 3 minutos, o índice de exploração foi calculado posteriormente.

Experimento 3: Investigou-se a memória de trabalho de fêmeas e machos das linhagens SHR e SLA16 no teste de alternância espontânea (CAE), após o tratamento crônico com ritalina® na adolescência. O animal foi colocado no centro do labirinto em Y e o número de entradas nos braços e alternâncias espontâneas foram contabilizadas após o fim do teste.

2.5.2 Segundo bloco experimental

O segundo bloco experimental teve como objetivo investigar os efeitos da ritalina® em longo prazo, 4 meses após o fim do tratamento, para isso foram utilizados os mesmos animais tratados com a droga durante a adolescência e testados na idade adulta 24 SHR (12 fêmeas e 12 machos) e 24 SLA16 (12 fêmeas e 12 machos) para verificar os possíveis efeitos da droga após a descontinuação do tratamento, os animais tinham em torno de 4 meses. Foram realizados dois experimentos (experimentos 4 e 5) entre as 09:00 até 18:00.

Experimento 4: Examinou-se o perfil locomotor de fêmeas e machos das linhagens SHR e SLA16 no teste do CA na idade adulta, 4 meses após o fim do tratamento crônico com ritalina® na adolescência. Os animais foram expostos ao aparato por 5 minutos e seu comportamento foi gravado por uma câmera de vídeo e analisado posteriormente.

Experimento 5: Realizou-se o teste de RO para analisar a memória de curta duração 4 meses após o fim do tratamento crônico com ritalina® na adolescência nas fêmeas e machos das linhagens SHR e SLA16. O protocolo foi o mesmo que o experimento 2 e contou primeiramente com a fase de habituação por 10 minutos, 24 horas depois passou pela fase de familiarização por 3 minutos e depois de 30 minutos pela fase de teste por 3 minutos. O experimento foi gravado por uma câmera de vídeo e o índice de discriminação foi calculado.

Quadro 1. Resumo dos cinco experimentos desenvolvidos neste trabalho.

	Experimento	Tratamento	Aparato	Protocolo
1º Bloco Experimental	Experimento 1	Crônico (16 dias) 2mg/kg de MFD ou SAL	Campo Aberto	5 min/ 1 mês após o fim do tratamento
	Experimento 2	Crônico (16 dias) 2mg/kg de MFD ou SAL	Reconhecimento de objetos	Habituação: 10 min Treino: 3 min Teste: 3 min/1 mês após o fim do tratamento
	Experimento 3	Crônico (16 dias) 2mg/kg de MFD ou SAL	Alternação espontânea	5 min/1 mês após o fim do tratamento
2º Bloco Experimental	Experimento 4	Crônico (16 dias) 2mg/kg de MFD ou SAL	Campo Aberto	5 min/4 meses após o fim do tratamento
	Experimento 5	Crônico (16 dias) 2mg/kg de MFD ou SAL	Reconhecimento de objetos	Habituação: 10 min Treino: 3 min Teste: 3 min/4 meses após o fim do tratamento

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados experimentais foram submetidos a uma análise estatística no software Statistica®, versão 10 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Todos os dados foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Levene. Para os dados de massa corporal (em gramas) foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) de duas vias (linhagem e tratamento) com medidas repetidas. Já os experimentos 1, 2, 3, 4 e 5 foram submetidos a uma ANOVA de duas vias, separadamente por sexo com variáveis independentes, sendo que no experimento 2 e 5, além de ser realizado uma ANOVA, foi utilizado o teste-t. Os valores estão apresentados pela média \pm erro padrão da média (E.P.M). O nível de significância adotado em todos os experimentos foi $p \leq 0,05$. As representações em gráfico, presentes neste estudo, foram feitas a partir do software GraphPad Prism, versão 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

3 RESULTADOS

3.1 PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

Ao longo do tratamento com ritalina®, no intervalo de 3 dias foram realizadas medições da massa corporal dos animais das linhagens SHR e SLA16 fêmeas e machos até o termino do tratamento que teve duração de 16 dias, com o objetivo de verificar qualquer perda ou ganho de massa durante o período que foram tratados com a droga. Foi observado um efeito significativo do fator linhagem na massa corporal em fêmeas $F(1, 44)=7,3127$; $p=0,00970$; $SLA16>SHR$) e um efeito significativo de tempo ($F(5, 220)=971,77$; $p=0,0000$ (Fig. 8A). Entretanto, não foi observado efeito significativo de linhagem em machos, somente efeito significativo de tempo ($F(5, 215)=722,23$; $p=0,0000$ (Fig. 8B). Isso mostra que fêmeas e machos das linhagens SHR e SLA16 ganharam peso de forma semelhante ao longo do tratamento.

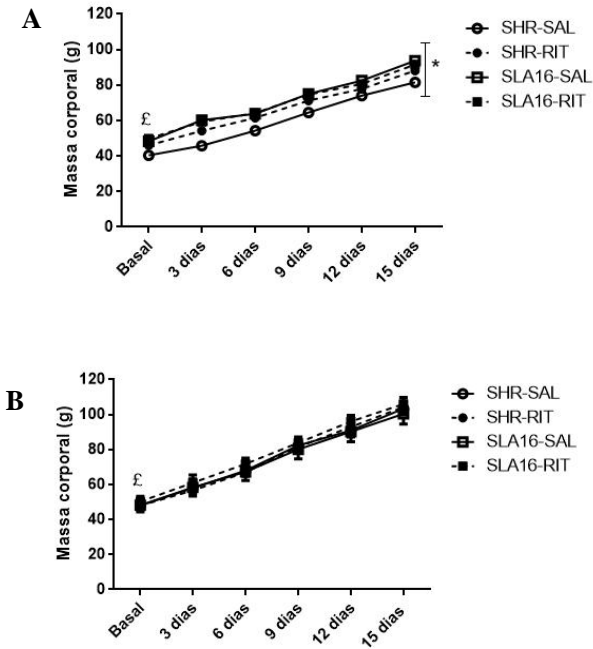


Figura 8. Massa corporal dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos ao longo do tratamento com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL). Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$. £ = efeito de tempo.

3.1.1 Experimento 1 - Campo Aberto

No teste do CA os animais exploraram o aparato durante 5 minutos, na idade adulta, 1 mês após tratamento crônico com ritalina®. Foi observado um efeito significativo do fator linhagem para os parâmetros: distância total em fêmeas ($F(1, 44)=23, 299$; $p=0,0002$; SLA16>SHR) (Fig. 9A) e machos ($F(1, 42)=17, 925$; $p=0,00012$;

SLA16>SHR) (Fig. 9B); distância periférica em fêmeas ($F(1, 44)=14, 982$; $p=0,00036$; SLA16>SHR) (Fig. 10A) e machos ($F(1,$

42)=17, 159; $p=0,00016$; $SLA16>SHR$) (Fig.

10B); distância no centro em fêmeas ($F(1, 44)=9,7068$; $p=0,00323$; $SLA16>SHR$) (Fig. 11A) e machos ($F(1, 42)=4,19$; $p=0,0496$; $SLA16>SHR$) (Fig. 11B); e número de entradas no centro em fêmeas ($F(1, 44)=11,577$; $p=0,00143$; $SLA16>SHR$) (Fig. 12A).

Em machos, na medida distância total ($F(1, 42)=2,7588$; $p=0,10417$) foi observado uma interação sugestiva entre tratamento e linhagem, que aparenta um efeito da ritalina® na diminuição da hiperatividade apenas nos animais SHR.

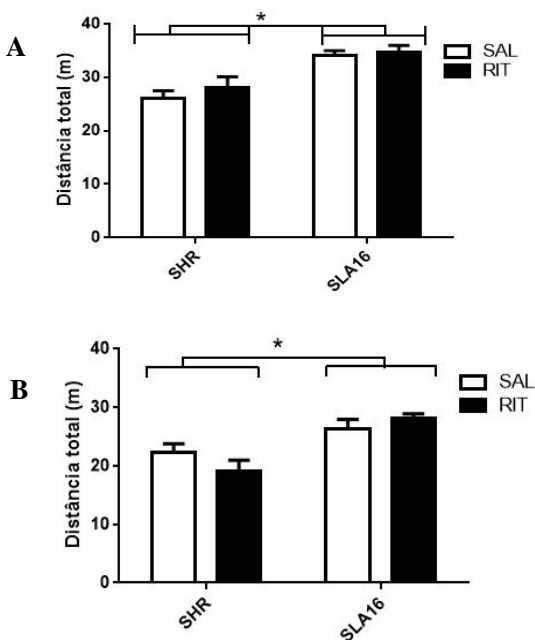


Figura 9. Distância total dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$.

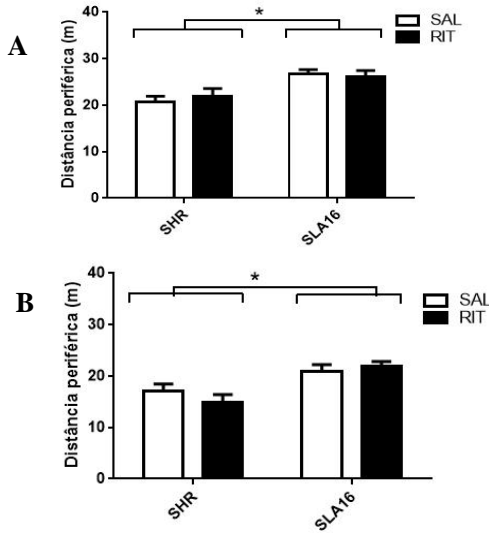


Figura 10. Distância periférica dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$.

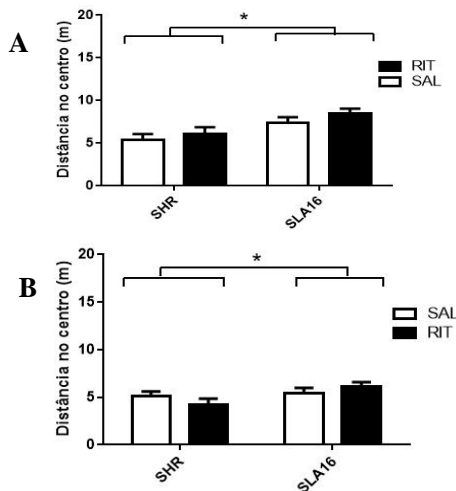


Figura 11. Distância no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$.

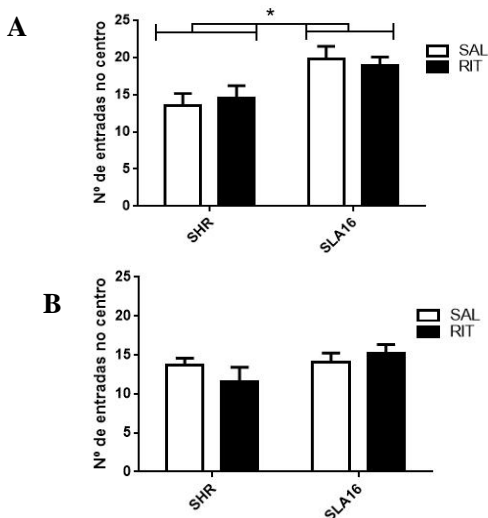


Figura 12. Número de entradas no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$.

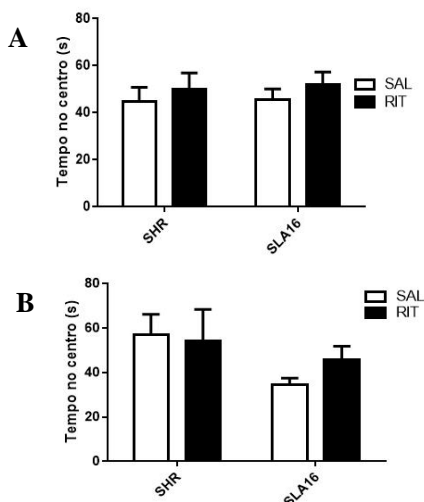


Figura 13. Tempo no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$.

3.1.2 Experimento 2 – Reconhecimento de objetos

O teste de RO foi adaptado de um procedimento experimental previamente descrito (NORMAN & EACOTT, 2004; ABE et al, 2004) e consistiu de três fases: o animal passou por um período de habituação para se familiarizar ao ambiente novo 24 horas antes da sessão de treino e teste. Foi calculado o índice de discriminação: (ID) – $ID = (Tn - Tf) / (Tn + Tf)$ para fêmeas e machos no teste e no treino.

Em fêmeas, a ANOVA de duas vias (linhagem e tratamento), para o ID no teste, demonstrou um efeito significativo do fator linhagem ($F(1, 44) = 7,1505$; $p = 0,01048$; $SLA16 > SHR$) (Fig. 14B) mostrando que as fêmeas SLA16 exploraram mais o objeto novo, independentemente do tratamento.

Quando realizamos o teste-t de uma única amostra com o intuito de comparar os valores contra o $ID = 0$ podemos verificar diferença em fêmeas SLA16 tratadas com ritalina® ($t(11) = 5,482339$, $p = 0,000191$), mas nenhuma diferença em fêmeas SLA16 tratadas com salina ou em fêmeas SHR. Este resultado sugere que a ritalina® foi capaz de aumentar a capacidade de discriminação do objeto novo, somente em fêmeas da linhagem SLA16 (Fig. 14B).

Em machos, a ANOVA de duas vias (linhagem e tratamento), para o ID no teste, demonstrou um efeito sugestivo de interação entre linhagem e tratamento no teste ($F(1, 43) = 3,4199$; $p = 0,07129$) (Fig. 15B) sugerindo que a ritalina® foi capaz de aumentar a capacidade de discriminação do objeto novo, somente em machos da linhagem SLA16.

Quando realizamos o teste-t de uma única amostra com o intuito de comparar os valores contra o $ID = 0$ podemos verificar diferença em machos SHR tratados com ritalina ($t(11) = 5,967123$, $p = 0,000094$), salina ($t(11) = 5,516006$), $p = 0,000182$), SLA16

tratados com ritalina ($t(11) = 9,309720$), $p = 0,00002$), salina ($t(10) = 3,418509$), $p = 0,006564$). Este resultado sugere que todos os grupos experimentais exploraram mais o objeto novo (Fig. 15B).

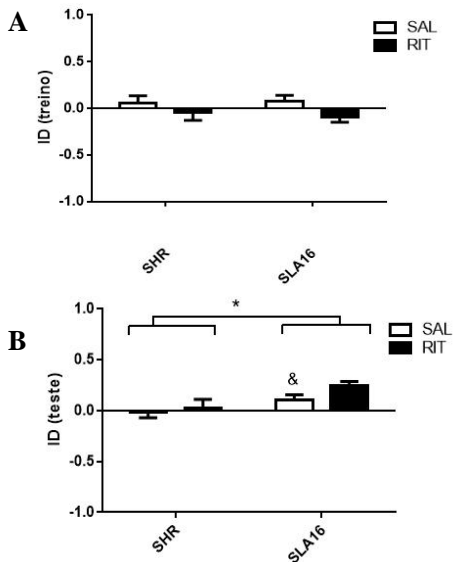


Figura 14. Índice de discriminação das fêmeas SHR e SLA16. (A) Índice de discriminação no treino e (B) Índice de discriminação no teste. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$ (ANOVA de duas vias). &= $p < 0,005$ comparação com o ID=0 (teste t de uma única amostra).

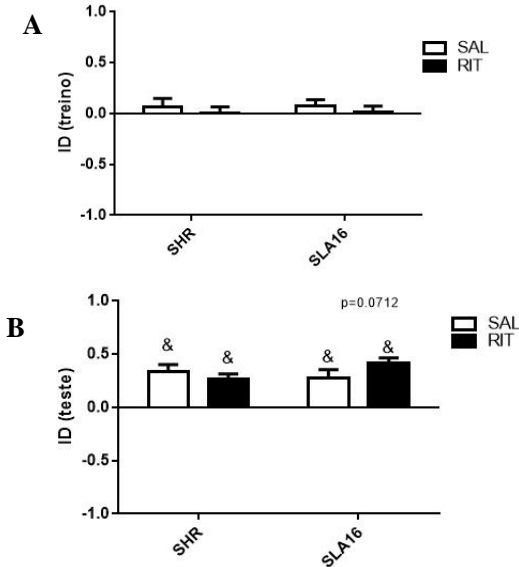


Figura 15. Índice de discriminação dos machos SHR e SLA16. (A) Índice de discriminação no treino e (B) Índice de discriminação no teste. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$ (ANOVA de duas vias). &= $p < 0,005$ comparação com o ID=0 (teste t de uma única amostra).

3.1.3 Experimento 3 – Alternação espontânea

A tarefa de alternação espontânea no labirinto em Y é geralmente aceita como um paradigma que avalia a memória de trabalho, ou memória de curto prazo (SARTER et al., 1988). No protocolo que utilizamos, cada rato foi posicionado no meio do labirinto em Y, podendo explorar livremente por 5 minutos os braços A, B e C. Uma alternação consistiu em três entradas consecutivas em braços diferentes. O número de alternação espontânea foi calculado. Não foram encontradas diferenças significativas para a porcentagem de alternação espontânea em fêmeas (Fig. 16A) e machos (Fig. 16B).

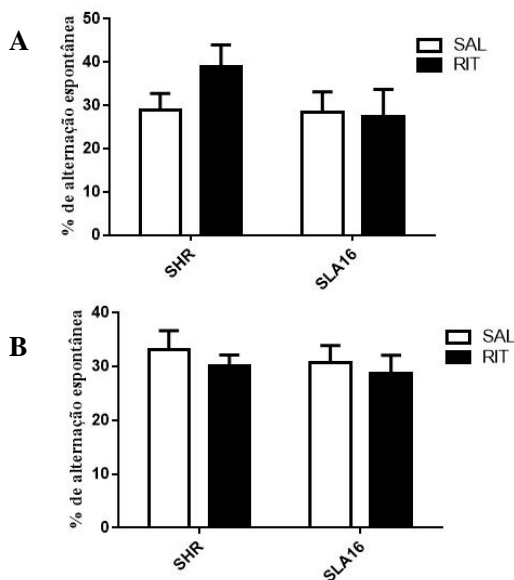


Figura 16. Número de alterações espontâneas dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no labirinto em Y. Representadas médias dos grupos + E.P.M.

3.2 SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL

3.2.1 Experimento 4- Campo Aberto

No segundo bloco experimental deste trabalho, foi realizado o teste do CA 4 meses após o fim do tratamento crônico ritalina®, os animais permaneceram explorando o aparato por 5 minutos. Foi observado um efeito significativo do fator linhagem para os parâmetros: distância total em fêmeas ($F(1, 41)=15, 100; p=0,000036; SLA16>SHR$) (Fig. 16A) e machos ($F(1, 42)=32, 918; p=0,00000; SLA16>SHR$) (Fig. 16B); distância

periférica em fêmeas ($F(1, 41)=10, 524; p=0,00235; SLA16>SHR$) (Fig. 17A) e machos ($F(1, 42)=26, 168; p=0,00001; SLA16>SHR$) (Fig. 17B); distância no centro em fêmeas ($F(1, 41)=14,034; p=0,00055; SLA16>SHR$) (Fig. 18A) e machos ($F(1, 42)=23, 097;$

$p=0,00002$; $SLA16>SHR$) (Fig. 18B); número de entradas no centro em fêmeas ($F(1, 41)=10,585$; $p=0,00229$; $SLA16>SHR$) (Fig. 19A) e machos ($F(1, 42)=47, 287$;

$p=0,00000$; $SLA16>SHR$) (Fig. 19B); e tempo no centro em fêmeas ($F(1, 41)=4,8164$; $p=0,03391$; $SLA16>SHR$) (Fig. 20A).

Nos machos foi observado um efeito significativo de tratamento no parâmetro tempo no centro ($F(1, 42)= 5,8204$, $p=0,02029$; $RIT>SAL$), esses resultados direcionam que a ritalina® administrada na adolescência alterou a permanência no centro dos animais na idade adulta, após a descontinuação do tratamento.

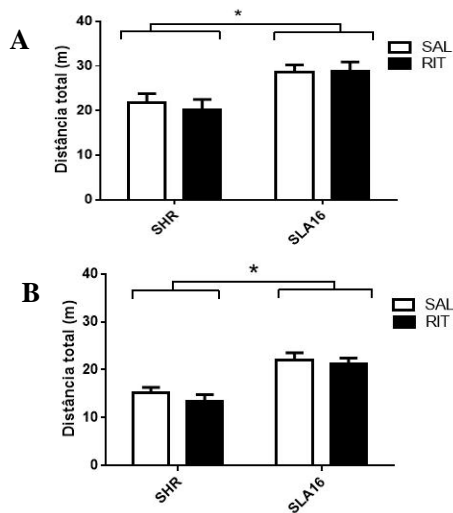


Figura 17. Distância total dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p<0,005$.

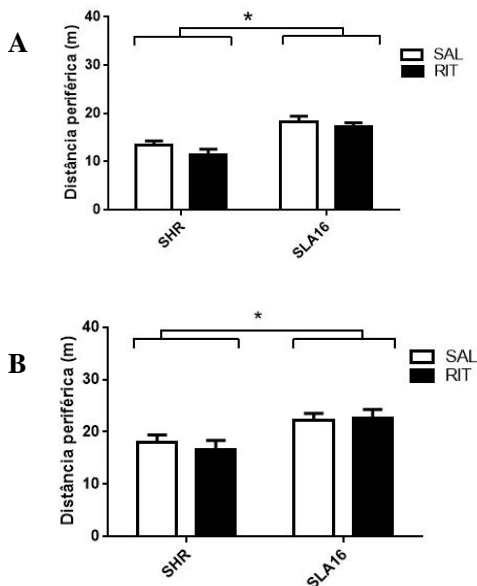


Figura 18. Distância periférica dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$.

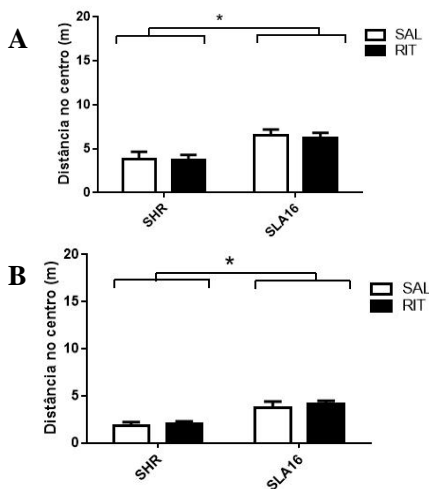


Figura 19. Distância no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$.

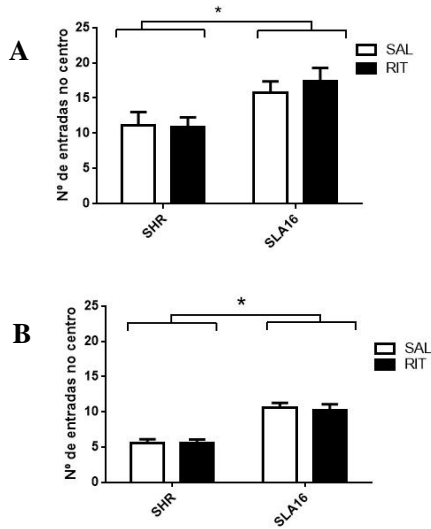


Figura 20. Número de entradas no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$.

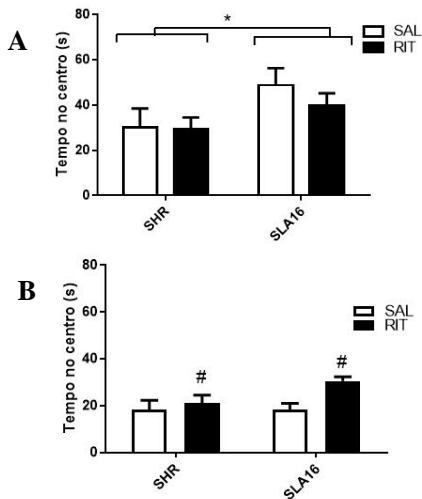


Figura 21. Tempo no centro dos animais SHR e SLA16, (A) fêmeas e (B) machos tratados com ritalina® (RIT) ou veículo (SAL) no CA. Representadas médias dos grupos + E.P.M. * = efeito de linhagem $p < 0,005$. # = efeito de tratamento $p < 0,005$.

3.2.2 Experimento 5- Reconhecimento de objetos

No segundo bloco experimental foi realizado o teste de reconhecimento de objetos 4 meses após o fim do tratamento crônico com ritalina® para avaliar os efeitos da droga após a descontinuação do tratamento. Foi calculado o índice de discriminação: (ID) – $ID = (Tn - Tf) / (Tn + Tf)$ para fêmeas e machos no teste e no treino.

Em fêmeas, a ANOVA de duas vias (linhagem e tratamento), para o ID no teste, demonstrou um efeito significativo do fator tratamento ($F(1, 43) = 13,735$; $p = 0,00060$; $RIT > SAL$) mostrando que as fêmeas tratadas com ritalina® na adolescência, exploraram mais o objeto novo, independentemente da linhagem.

Quando realizamos o teste-t de uma única amostra com o intuito de comparar os valores contra o $ID = 0$ podemos verificar diferença em fêmeas SLA16 tratadas com ritalina ($t(11)4,307188$), $p = 0,001241$), mas nenhuma diferença em fêmeas SLA16 tratadas com salina. Fêmeas SHR tratadas com ritalina ($t(11)4,024613$), $p = 0,002000$), ou salina ($t(10)2,314576$), $p = 0,043170$) também apresentaram diferenças. Este resultado sugere que a ritalina® foi capaz de aumentar manter, em longo prazo, a capacidade de discriminação do objeto novo, somente em fêmeas da linhagem SLA16 (Fig. 21B).

Em machos, a ANOVA de duas vias (linhagem e tratamento), para o ID no teste, não apresentou efeitos significativos (Fig. 22B).

Quando realizamos o teste-t de uma única amostra com o intuito de comparar os valores contra o $ID = 0$ podemos verificar diferenças em machos SHR tratados com ritalina® ($t(11)4,590047$), $p = 0,000777$), salina ($t(11)4,104745$); $p = 0,001745$), SLA16

tratados com ritalina® ($t(11)0,000171$), $p = 0,000171$), salina ($t(10)5,687731$), $p = 0,000202$). Este resultado sugere que, em machos, todos os grupos experimentais exploraram mais o objeto novo (Fig. 22B).

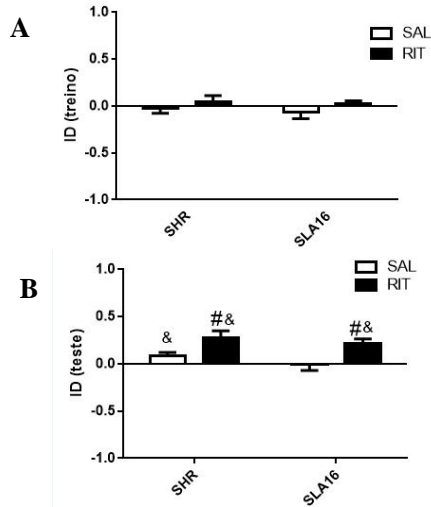


Figura 22. Índice de discriminação das fêmeas SHR e SLA16, (A) Índice de discriminação no treino e (B) Índice de discriminação no teste. Representadas médias dos grupos + E.P.M. #= efeito de tratamento= $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias). &= $p < 0,005$ comparação com o $ID=0$ (teste t de uma única amostra).

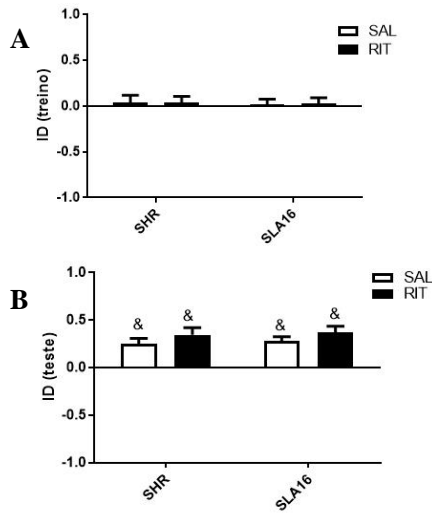


Figura 23. Índice de discriminação dos machos SHR e SLA16, (A) Índice de discriminação no treino e (B) Índice de discriminação no teste. Representadas médias dos grupos + E.P.M. &= $p < 0,005$ comparação com o $ID=0$ (teste t de uma única amostra).

4 DISCUSSÃO

O TDAH é um transtorno neurocomportamental mundialmente conhecido e geralmente é diagnosticado em crianças e adolescentes, podendo persistir durante a idade adulta. Várias drogas vêm surgindo na literatura para tratar a sua sintomatologia, mas o MFD continua sendo a mais utilizada para atenuar a hiperatividade, impulsividade e a desatenção, sintomas estes que caracterizam o transtorno. Para estudar e compreender melhor os endofenótipos do TDAH utiliza-se uma variedade ampla de modelos animais. Segundo Russel, Sagvolden e Johansen (2005) o TDAH pode ser caracterizado por uma combinação de fatores genéticos e ambientais que resultam em um distúrbio fortemente heterogêneo. Desta maneira, os modelos animais surgem com a intenção de mimetizar certos aspectos da sintomatologia complexa do transtorno e, na melhor das hipóteses, proporcionar suposições viáveis sobre as suas causas. Essas hipóteses podem então, posteriormente, serem testadas na clínica. Além disso, modelos animais podem ser usados para testar novas drogas para o tratamento do TDAH.

Nesse sentido, podemos encontrar na literatura diversos modelos animais utilizados para elucidar aspectos comportamentais e neurobiológicos do transtorno, porém não são todos os modelos que conseguem caracterizar e elucidar a sintomatologia do TDAH, alguns servem apenas para estudar endofenótipos específicos do transtorno. Ainda segundo Russel, Sagvolden e Johansen (2005) os modelos animais utilizados para estudar os subtipos do TDAH: desatento, hiperativo e impulsivo respondem diferentemente às drogas psicomotoras em relação aos seus controles, indicando que eles alteraram os sistemas de neurotransmissores no cérebro. Essa, e outras características, enfatizam a necessidade de estudar modelos animais de TDAH em vez de animais normais, com a finalidade de obter informações sobre os mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos das drogas utilizadas no tratamento de crianças com TDAH.

Assim, nesse trabalho utilizamos as linhagens SHR e SLA16, avaliando as suas potencialidades para estudar os endofenótipos do TDAH. A linhagem SHR pode ser definida aqui como um controle experimental, pois ela, na atualidade, é o principal modelo genético descrito para investigar este transtorno na literatura mundial. É importante enfatizar que alguns autores possuem algumas críticas ao uso da linhagem SHR como modelo do TDAH, já que cada vez mais os resultados comportamentais mostram que seus sintomas não são

consistentes e equivalentes aos pacientes diagnosticados com o transtorno (VAN DEN BERGH et al., 2006; ALSOP, 2007). Ou ainda, outros estudos indicam que a linhagem pode não responder a principal droga que é utilizada para tratar a sintomatologia do transtorno: o MFD (BIZOT et al., 2007; FERGUSON et al., 2007). Assim, a validação farmacológica da linhagem SHR como modelo de TDAH pode ser vista como controversa na literatura, alguns estudos não conseguiram encontrar as características comportamentais observadas nos animais ou também já foi demonstrado que estas características estão presentes apenas em idades específicas e em condições particulares de experimentação (BULL et al., 2000; FERGUSON & CADA, 2003; VAN DEN BERG et al., 2006). Nesse sentido, propusemos a linhagem SLA16 como um melhor modelo para estudar os endofenótipos do TDAH, visto que em alguns pontos ela poderia apresentar características mais exacerbadas que a linhagem SHR.

O primeiro bloco experimental deste trabalho consistiu em um tratamento crônico com MFD (ritalina®) em ratos machos e fêmeas adolescentes, com o intuito de avaliar o perfil comportamental durante a idade adulta das linhagens SHR e SLA16. Como se refere a um tratamento crônico com um psicoestimulante, que na literatura é mencionado como causador de alterações na massa corporal, é de grande importância o acompanhamento do bem estar animal ao longo das semanas de experimentação. Logo os animais foram pesados em um intervalo de 3 dias até o final do tratamento, que teve duração de 16 dias. O objetivo foi verificar qualquer perda ou ganho de massa durante o período em que ocorreu o tratamento. Foi observado um efeito significativo de linhagem em fêmeas, onde pode ser observado que os animais da linhagem SLA16 ganharam mais massa quando comparado às SHR (Fig. 8A). Entretanto, não foi observado efeito de linhagem em machos. Além disso, animais de ambas as linhagens e sexos tiveram aumento de massa ao longo do tratamento.

Estudos utilizando tratamento crônico com MFD relataram alterações na massa corporal, consumo de alimentos, atividade locomotora, medidas de exploração e ansiedade (ROBISON et al., 2017). Vanina et al., 2002; Faraone et al., 2008; Thanos et al., 2015 concluíram que o tratamento com MFD, provoca uma redução na massa corporal e que a massa corporal reduzida, apesar do aumento da ingestão alimentar, pode ser atribuído aos efeitos metabólicos dos estimulantes (ERSCHE et al., 2013). Os animais SHR e SLA16 fêmeas e machos não mostraram redução de massa corporal, isso pode ser atribuído ao fato que os animais tinham 28 dias quando iniciaram o tratamento e

naturalmente durante a fase de crescimento é normal que os animais ganhem massa.

Para o tratamento crônico foi utilizado uma dosagem de 2mg/kg administrada 2 vezes ao dia, a literatura mostra variações com dosagens utilizadas em tratamentos crônicos com MFD durante a adolescência de ratos. Doses caracterizadas como baixas (<3 mg/kg), são reconhecidas por melhorar a atenção (BERRIDGE et al., 2006; ZHU et al., 2007) e doses mais altas (> 5 mg/kg) podem resultar em deficiências (BERRIDGE et al., 2011). Variações são encontradas na literatura de 1,0 mg/kg até 10 mg/kg, a maioria dos estudos tem utilizado a dose de 2 mg/kg (MAGUE et al., 2005; ADRIANI et al., 2006; AUGUSTYNIK et al., 2006). A variabilidade talvez seja resultante de diferenças tanto no tempo como duração do tratamento. Por exemplo, enquanto alguns estudos mostraram esquemas de administração dando ênfase nas janelas de desenvolvimento tão pequenas quanto uma semana (BRANDON et al., 2001), outras sustentaram tratamento por 4 semanas ou mais (GRAY et al., 2007; VALVASSORI et al., 2007; THANOS et al., 2007; BRITTON & BETHANCOURT, 2009). A maioria dos estudos tem como alvo a adolescência precoce (CARLEZON et al., 2003; WILEY et al., 2009) ou intermediária (ADRIANIA et al., 2006; AUGUSTYNIK et al., 2006).

A via de administração da droga é outro ponto em que vem surgindo grandes discussões na literatura, segundo Volkow & Insel (2003) a via de administração do MFD usado em animais é tipicamente por injeção e não oral como ele é usado clinicamente. Os seres humanos tratados com TDAH recebem MFD por via oral, que pode ser de duas maneiras: formulação de liberação imediata administrada duas ou três vezes ao dia, quanto na formulação de liberação prolongada usada apenas uma vez ao dia (VOLKOW & SWANSON, 2003). Ao contrário do que é observado na clínica, na maioria dos estudos com animais, o MFD é administrado por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. Estudos demonstraram que estas vias de administração diferem significativamente da administração oral, especificamente no que diz respeito à magnitude e tempo até à concentração sérica de pico, semivida e taxa de eliminação (KUCZENSKI & SEGAL, 2005) e curso de tempo de aumento da DA extracelular e respostas locomotoras (GERASIMOV et al., 2000; KUCZENSKI & SEGAL, 2001). Assim, a via de administração escolhida para realizar o tratamento crônico nos ratos, no presente estudo, foi oral por meio de gavagem levando em consideração os efeitos da droga quando administrada oralmente em comparação a outros meios de aplicação e o observado na clínica.

Desse modo, um mês após o término do tratamento crônico o primeiro experimento comportamental compreendeu em avaliar os índices locomotores das linhagens quando expostos ao teste de CA por 5 minutos. O CA é utilizado principalmente para investigar a atividade locomotora e comportamentos relacionados à ansiedade em roedores (PRUT & BELZUNG, 2003). A Distância na área central do aparato está mais correlacionada com a emocionalidade do animal, já a distância periférica envolveria predominantemente o componente motor (RAMOS, 2008). Os animais SLA16 exibiram maior distância total, distância periférica e distância no centro em fêmeas e machos e número de entradas no centro só foi visto em fêmeas. Assim os resultados sugerem que a linhagem SLA16 apresenta maiores escores de locomoção no teste do campo aberto quando comparados aos controles SHR, efeito observado em ambos os sexos. Estes resultados sugerem que a linhagem SLA16 apresente um perfil hiperlocomotor e corroboram que o locus diferencial exerce influência sobre a atividade locomotora (DE MEDEIROS et al., 2013; ANSELMINI et al., 2016; PERTILE et al., 2017).

Não foi observado efeito significativo de tratamento nos animais analisados no teste de CA 1 mês após o fim do tratamento com ritalina®, apenas em machos na distância total foi visto uma interação sugestiva entre linhagem e tratamento, que aparenta um efeito da ritalina® na diminuição da hiperatividade apenas nos animais SHR. Estudos encontrados na literatura são controversos em relação aos efeitos da ritalina® na hiperatividade em animais que são tratados na adolescência, por exemplo, já foi observado um aumento da atividade locomotora espontânea (CARLEZON et al., 2003), nenhum efeito (VALVASSORI et al., 2007) ou diminuição da atividade (GRAY et al., 2007; WILEY et al., 2009). Por exemplo, Somkuwar et al. (2016) relata em um de seus estudos uma diminuição da hiperatividade na idade adulta de ratos SHR tratados cronicamente com ritalina na adolescência. Estes resultados estendem relatos anteriores que mostram que a hiperatividade em ratos Sprague-Dawley e SHR adolescentes foi reduzida durante o tratamento com MFD agudo e sub-crônico (KUCZENSKI & SEGAL, 2002; UMEHARA et al., 2013).

Em contrapartida, como foi observado no presente estudo que a ritalina® não teve efeito significativo na hiperatividade nos ratos SHR e SLA16 outros estudos já observaram também o mesmo fato. Por exemplo, Ramos, Berton et al. (1997) relataram que é que a hiperatividade reconhecida nos animais SHR é vista apenas quando os ratos SHR são comparados aos ratos WKY. Van den bergh et al. (2006)

mencionam que independente da causa da hiperatividade locomotora vista nos ratos SHR, este aumento não é reduzido pela administração de MFD. Em contraste, a atividade locomotora dos ratos WKY é atenuada por MFD. Assim, podemos observar alguns estudos evidenciando que a linhagem SHR mostra um desempenho ruim e que nem sempre consegue ser replicável no teste do CA (FERGUSON et al., 2003; HARD et al., 1985; KNARDAHL & SAGVOLDEN, 1979; MYERS et al., 1982; SAGVOLDEN et al., 1993; WULTZ et al., 1990).

Após o teste do CA para avaliar a atividade locomotora dos animais, foi realizado o teste de reconhecimento de objetos com o intuito de avaliar aspectos atencionais das linhagens SHR e SLA16. O teste de RO em geral, consiste em duas fases. Na primeira fase, o animal é apresentado ao objeto a ser familiarizado em um ambiente diferente que normalmente está acostumado (treino). Após a exposição do objeto familiar o animal é devolvido à sua gaiola por um período de retenção. Na segunda fase, o animal é reexposto ao ambiente do treino e agora apresentado a dois objetos: o objeto que foi previamente utilizado e um objeto novo. O reconhecimento de objetos é um teste válido e baseado na premissa que os animais têm a capacidade de distinguir os objetos passando mais tempo na exploração/avaliação do objeto novo (BEVINS, 2006).

Durante a fase de familiarização não foi observado diferença no ID dos animais das linhagens SHR e SLA16 tanto de fêmeas quanto de machos, mostrando que os animais não tiveram preferência por nenhum objeto em específico, o que já é esperado, pois durante a fase de familiarização os objetos são idênticos. Na fase de teste foi observado, em fêmeas, um efeito significativo de linhagem, onde pode ser visto que a linhagem SLA16 discriminou mais o objeto novo do que a linhagem SHR. Fadanni (2018) mostrou em seu trabalho que no teste de RO os animais machos da linhagem SLA16 exploram mais o objeto novo do que os ratos SHR, e não apresentam diferenças quanto ao objeto familiar.

Já foi mencionado em trabalhos anteriores do nosso laboratório que o comportamento dos SLA16 parece mudar em relação aos ratos SHR principalmente quanto a parâmetros locomotores quando há um fator novidade (DE MEDEIROS et al., 2013; ANSELMINI et al., 2016). Essa busca por novidade pode ser denominada neofilia, definida como a atração que um animal apresenta em relação a um objeto ou lugar basicamente porque é novo (GREENBERG, 2003). Em termos comportamentais, a neofilia pode ser considerada como uma abordagem baseada na curiosidade (HUGHES, 2007). Entretanto, já foi

mencionado em trabalhos anteriores que os ratos SLA16 em relação à memória de trabalho, parecem ser similares aos SHR (GRANZOTTO, 2016). O teste de RO é um teste classifico para avaliar memória, mas por ser um ambiente novo, com um objeto diferente do qual os animais estavam explorando, a neofilia está correlacionada, existe uma comparação direta com aprendizado apontando que a linhagem SLA16 apresenta um melhor desempenho em relação à linhagem SHR no teste de RO.

O teste-t quando utilizado no teste do reconhecimento de objetos tem como abordagem principal comparar a média de cada grupo com o ID=0, que representa neutralidade (ausência de preferência por um ou outro objeto). Na hipótese de diferença significativa no sentido positivo (ID>0), sugere-se que o grupo explorou mais o objeto novo do que o familiar e, por consequência, foi “bem-sucedido” na tarefa (ANTUNES & BIALA, 2012) foi observado diferença significativa nas fêmeas SLA16 tratadas com ritalina®. Isso sugere que a ritalina® demonstrou melhora na atenção, ou na capacidade de discriminação de ratas SLA16, mas não das SHR. Os machos não apresentaram efeitos significativos, apenas um efeito sugestivo foi observado na interação entre linhagem e tratamento, sugerindo que a ritalina® teve a capacidade de aumentar o poder de discriminação do objeto novo, apenas em machos da linhagem SLA16. Este fato sugere uma maior atenção e estudos voltados para as fêmeas desta linhagem, já que as mesmas poderiam ser interessantes para investigar melhor os processos relacionados à atenção e à memória direcionados ao TDAH.

Pietrzak et al. (2006) mencionou melhorias na memória de curto e longo prazo em 58% de estudos após tratamento com MFD. Como já mencionado anteriormente, a dose utilizada em tratamentos crônicos com MFD vai ser crucial para um bom desempenho do animal, isso pode ser observado também no teste de RO. Por exemplo, animais tratados com as doses de 3 e 5 mg/kg de MFD durante 21 dias demonstraram prejuízo no reconhecimento de objetos em todos os três períodos (habituação, treino e teste) (LEBLANC- DUCHIN & TAUKULIS, 2007).

O terceiro teste realizado nos animais com 1 mês após o fim do tratamento foi o teste de alternância espontânea, este teste avalia atenção (KAMIMURA et al., 2001) e memória de trabalho (SARTER et al., 1988). Atenção prejudicada resulta em baixa porcentagem de alternância espontânea, porque os ratos precisam explorar um novo braço em vez de retornar aos que já foram visitados anteriormente (KISHIKAWA et al., 2014). Não foram observadas diferenças significativas no número de

alterações espontâneas em fêmeas e machos.

Trabalhos anteriores utilizando o teste de alternância espontânea no labirinto em Y para avaliar memória em ratos, comparando as linhagens SHR e SLA16 não mostraram diferenças para a porcentagem de alternância espontânea (ANSELMINI et al., 2016).

O teste de RO e CAE são testes relacionados com aprendizado/memória, enquanto o RO mostrou diferenças na aprendizagem o CAE não apresentou alterações significativas. Galeano et al. (2014) menciona que discrepâncias nos resultados em testes que tem o mesmo objetivo podem estar relacionadas à alguma complexidade na tarefa, visto que os dois testes não possuem um grau de dificuldade elevado.

O segundo bloco experimental teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos em longo prazo da droga após a descontinuação do tratamento, com isso os animais passaram pelos testes de CA e RO quatro meses após o término do tratamento crônico com ritalina®. Swanson & Volkow (2008) citam que o aumento do uso de MFD para o tratamento do TDAH em crianças tem despertado a curiosidade dos pesquisadores para avaliar os efeitos em longo prazo da droga, principalmente os efeitos do MFD no sistema nervoso em desenvolvimento (FONE & NUTT, 2005) que continua a se desenvolver e amadurecer na 2ª a 3ª década de vida (SOWELL et al., 2003). Além disso, exposição a drogas como cocaína, amfetamina e MFD no cérebro imaturo pode levar a alterações na expressão gênica gerando mudanças permanentes na capacidade de resposta celular e conectividade sináptica (ROBINSON & KOLB, 2004; STANWOOD & LEVITT, 2004; ANDERSEN, 2005).

Poucos são os estudos que avaliaram os efeitos de longo prazo do MFD. Alguns mostraram efeitos prejudiciais, em parte, na idade adulta. Por exemplo, Somkuwar (2016) mostrou que a interrupção do tratamento na adolescência produziu uma redução de longo prazo na hiperatividade em SHR adultos, mas a consequência adversa foi um aumento da impulsividade nestes ratos. Weissenberger et al. (2001) apresentou em seu trabalho que o MFD administrado em ratos jovens, resultou em níveis alterados de transportadores de dopamina, que persistiram até a idade adulta, muito tempo após o término do tratamento. Outro estudo em ratos descobriu que o MFD prejudicava a espermatogênese após onze semanas de tratamento, o que apontava que a droga poderia reduzir a fertilidade masculina (KIANIFARD et al., 2013). Além disso, o tratamento crônico com MFD durante a adolescência, seguido de descontinuação do tratamento, aumentou a

autoadministração de cocaína em SHR adultos comparado aos controles WKY (HARVEY et al., 2011). Já foi observado também que o MFD crônico nos ratos SHR adolescentes diminui os marcadores de plasticidade neuronal no córtex pré-frontal (FUMAGALLI, CATTANEO et al., 2010), sugerindo que o córtex pré-frontal pode ser crítico na modulação das consequências de longo prazo do tratamento com MFD durante a adolescência.

Assim, para avaliar a atividade locomotora dos ratos 4 meses após o fim do tratamento crônico com ritalina®, foi utilizado o teste do campo aberto seguindo o mesmo protocolo utilizado 1 mês após o fim do tratamento. Os animais da linhagem SLA16 continuaram exibindo uma maior locomoção nos parâmetros avaliados: locomoção total, locomoção periférica, locomoção no centro, número de entradas no centro e tempo no centro somente foi observado em fêmeas. Nos machos foi observado um efeito de tratamento no parâmetro tempo no centro, sugerindo que a ritalina® administrada na adolescência teve um efeito persistente e alterou o tempo no centro destes animais após a descontinuação do tratamento na idade adulta.

Já no teste de reconhecimento de objetos, não foram observados efeitos significativos de linhagem em ambos os sexos. Porém, os animais mostraram no teste de fêmeas um efeito significativo de tratamento, sugerindo que os animais tratados com ritalina® exploraram mais o objeto novo. Ou seja, a ritalina® em longo prazo melhorou a discriminação destes animais. A ideia de que o MFD atue na exploração maior de objetos novos em ambas as idades sugere que o MFD pode alterar a memória de reconhecimento e/ou também está correlacionado com a preferência por novidade (HEYSER et al., 2004). A busca por novidade, neofilia, é um traço bastante presente em humanos diagnosticados com TDAH, principalmente com o subtipo impulsivo/hiperativo (PARK et al., 2016).

Andersen (2003) cita que a exposição prolongada aos psicoestimulantes no desenvolvimento de sistemas neuronais imaturos pode resultar em alterações neuronais que em longo prazo são permanentes, resultando em funções cerebrais disruptivas que podem permanecer na idade adulta. As consequências do uso do MFD ainda não foram determinadas em populações clínicas e o aumento dramático nas prescrições destas drogas ao longo da última década, tem se tornado preocupante. A escassez de informações sobre possíveis riscos em longo prazo para o desenvolvimento do cérebro destaca as necessidades de pesquisas clínicas para determinar a gravidade precisa dos sintomas que justificam o tratamento com o estimulante (OLFSON et al., 2002). Van

der marel et al. (2015) mostrou dados interessantes em seu trabalho em relação aos efeitos de longo prazo do MFD. A droga exerce diferentes efeitos comportamentais em ratos adolescentes e adultos. Por exemplo, a memória no teste de reconhecimento de objetos foi prejudicada em ratos tratados cronicamente na adolescência, enquanto o comportamento depressivo aumentou apenas em ratos tratados durante a idade adulta. Além disso, independentemente do tempo de tratamento foi observado efeitos significativos em várias medidas da função e estrutura do hipocampo.

Outro fato interessante, que foi observado no teste de reconhecimento de objetos, é que nas fêmeas testadas 1 mês ou 4 meses após o tratamento surgiram efeitos significativos de linhagem e tratamento. Esse fato reforça o que alguns autores mencionam sobre a importância de mais estudos em fêmeas, visto que na literatura é encontrado um maior número de pesquisas com machos. Bloom (2012) menciona que apesar de ser comum a ausência de estudos com fêmeas na pesquisa científica mundial, este fato foi justificado pelo aparente viés de sexo no TDAH, visto que a taxa de diagnóstico em homens ao longo da vida é bem maior do que em mulheres. As diferenças nos índices de diagnóstico têm sido sugeridas, ao menos em parte, correlacionadas a diferenças nas manifestações dos sintomas. Enquanto os machos podem apresentar mais problemas comportamentais relacionados à hiperatividade e impulsividade, as fêmeas apresentam maior número de problemas ligados à desatenção (GAUB & CARLSON, 1997; GERSHON & GERSHON, 2002; BIEDERMAN et al., 2005). Romeo (2003), Sisk & Zehr (2005) mencionam que tais diferenças entre os sexos podem estar relacionadas à redução da espessura do córtex pré-frontal. A adolescência é uma época de grandes mudanças fisiológicas nos hormônios sexuais que são acompanhadas por mudanças maturacionais marcantes no cérebro, especialmente mudanças no remodelamento sináptico cortical, como a neurogênese. Já foi observado em um estudo que ratos machos Sprague-Dawley juvenis apresentam menor capacidade metabólica do córtex frontal do que fêmeas (SPIVEY et al., 2008).

O diagnóstico e o tratamento do TDAH em mulheres, provavelmente nos próximos anos, aumentará o número de pesquisas sobre possíveis diferenças sexuais em resposta ao tratamento com psicoestimulantes. Tem sido bem documentado que as mulheres apresentam respostas diferentes aos tratamentos farmacológicos devido a diferenças de sinalização farmacológica específicas do sexo (desenvolvimento do crescimento e distribuição hormonal) (BROWN et

al., 2000; ZAKHAROVA et al., 2009; TINGEN et al., 2010) e se mostraram mais sensíveis a alguns dos efeitos dos psicoestimulantes (WALKER et al., 2001; CARRIER & KABBAL, 2012; CHELARU et al., 2012; VAN SWEARINGEN et al., 2013). Por exemplo, estudos investigando respostas comportamentais aos psicoestimulantes mostram que essas drogas têm um efeito maior sobre as mulheres do que nos homens. Especificamente, ratos e camundongos fêmeas exibem uma sensibilização comportamental mais robusta, maior comportamento estereotipado e também pode ser observado um maior aumento em sua atividade locomotora quando comparado a ratos machos em resposta à amfetamina (SCHNEIDER & NORTON, 1979; ROBINSON, 1984). Outros estudos mencionam que as diferenças entre os sexos em respostas aos psicoestimulantes pode ser devido a diferenças em hormônios presentes em fêmeas e machos e, especificamente, presença de hormônios ovarianos em mulheres (WENDY et al., 2000). Além disso, fêmeas e machos podem mostrar diferenças em relação a farmacocinética de algumas drogas, como o MFD. Bentley et al. (2015) relatou que após uma injeção de 5 mg/kg de MFD em ratos adultos, as concentrações cerebrais da droga eram consideravelmente mais altas nas mulheres. Outro estudo mostrou que indivíduos que receberam 0.3 mg/kg de MFD por via oral, as mulheres apresentavam concentrações plasmáticas mais baixas, mas eram mais sensíveis aos efeitos da droga (PATRICK et al., 2007).

Outra probabilidade é que as diferenças comportamentais poderiam ser no nível da neurotransmissão, receptores e transportadores de dopamina no cérebro (POHJALAINEN et al., 1998; ANDERSEN & TEICHER, 2000; LAVALAYE et al.,

2000; STALEY et al., 2001). Alguns estudos já mostraram diferenças na quantidade de dopamina liberada em resposta aos psicoestimulantes em homens e mulheres (MUNRO et al., 2006). Essas considerações reafirmam a importância de uma investigação mais aprofundada em relação as respostas comportamentais aos psicoestimulantes, em ratas, para elucidar os mecanismos subjacentes que envolvem as diferenças entre os sexos.

5 CONCLUSÕES

Na primeira hipótese deste trabalho foi proposto que linhagem SLA16 fosse um modelo genético mais adequado para estudar endofenótipos relacionados ao TDAH. Esta hipótese foi confirmada, pois a linhagem SLA16 exibiu uma maior hiperatividade locomotora em vários parâmetros analisados quando comparado à linhagem SHR e aparentemente fêmeas desta linhagem tem uma melhora na atenção quando tratada com ritalina® no teste de RO.

A segunda hipótese da presente pesquisa menciona que o tratamento crônico com ritalina® atenuaria endofenótipos específicos do TDAH na idade adulta nas linhagens SLA16 e SHR, como a desatenção e a hiperatividade. Esta hipótese foi parcialmente confirmada, visto que a ritalina® não alterou a locomoção das linhagens SHR e SLA16 no teste do CA. Porém, em relação ao RO, a ritalina® causou melhora na discriminação dos objetos novos nas fêmeas da linhagem SLA16, após 1 mês. Após 4 meses, a ritalina® causou melhora na discriminação dos objetos novos nas fêmeas das duas linhagens.

Assim, este trabalho sugere a importância da linhagem SLA16 como um potencial modelo genético para o estudo de endofenótipos do TDAH e que o tratamento com ritalina® durante a adolescência pode melhorar aspectos relacionados à atenção, mas não à hiperatividade na idade adulta. Além disso, ele enfatiza a importância da utilização de fêmeas na pesquisa básica dos comportamentos relacionados ao TDAH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANI, W.; CANESE, R.; PODO, F.; LAVIOLA, G. 1H MRS-detectable metabolic brain changes and reduced impulsive behavior in adult rats exposed to methylphenidate during adolescence. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 29, n.1, p. 116-125, 2007.
- ANDERSEN, S. L.; TEICHER, M. H. Andersen, S. L., and Teicher, M. H. Sex differences in dopamine receptors and their relevance to ADHD. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.24, p.137–141, 2000.
- ANDERSEN, S. L.; ARVANITOGIANNIS, A.; PLIAKAS, A. M.; LEBLANC, C.; CARLEZON, W. A. Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 13–14, 2002.
- ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 3–18, 2003.
- ANDERSEN, S. L. Stimulants and the developing brain. **Trends Pharmacological Sciences**, v. 26, n.5, p. 237–243, 2005.
- ANSELMINI, M.; CORREA, F.J. et al. Genetic evidence for chromosome 4 loci influencing learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 131, p. 182–191, 2016.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, 2012.
- American Psychiatric Association: APA.** Highlights of changes from DSM-IV-TR to DSM-5, 2013.
- AGGLETON, J.P.; ALBASSER, M.M.; AGGLETON, D.J.; POIRIER, G.L.; PEARCE, J.M. Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. **Behavioral Neuroscience**, v. 124, n.1, p.55– 68, 2010.

ALSOP, B. Problems with spontaneously hypertensive rats (SHR) as a model of attention deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **Journal of Neuroscience Methods**, v. 162, p. 42- 48, 2007.

AMODEO, L.R.; JACOBS-BRICHFORD, E.; MCMURRAY, M.S.; ROITMAN, J.D.

Acute and long-term effects of adolescent methylphenidate on decision-making and dopamine receptor mRNA expression in the orbitofrontal cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 324, p.100-108, 2017.

ARNSTEN, A.F.; DUDLEY, A.G. Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Behavioral Brain Functions**, v.22, p. 1-2, 2005.

AUSTERMAN, J. ADHD and behavioral disorders: assessment, management, and an update from DSM-5. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.82, p. S2–S7, 2015.

BACHMANN, C.J., WIJLAARS, L., KALVERDIJK, L.I., BURCU, M., GLAESKE, G., SCHILING-VENINGA, C.C.M. et al. Trends in ADHD medication use in children and adolescents in five western countries, 2005–2012. **European Neuropsychopharmacology**, v.27, n.5, p. 484–493, 2017.

BALCIOGLU, A.; REN, J.-Q.; MCCARTHY, D.; SPENCER, T.J.; BIEDERMAN, J.; BHIDE, P.G. Plasma and brain concentrations of oral therapeutic doses of methylphenidate and their impact on brain monoamine content in mice. **Neuropharmacology**, v. 57, p. 687– 693, 2009.

BANERJEE, T.D.; MIDDLETON, F.; FARAONE, S.V. Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. **Acta Paediatrica**, v. 96, n. 9, p.1269–1274, 2007.

BARI, A.; ROBBINS, T.W. Animal models of ADHD. **Current Topics Behavioral Neurosciences**, v. 7, p.149–185, 2011.

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

BENTLEY, J.; SNYDER, F.; BROWN, S. D.; BROWN, R. W.; POND, B. B. Bentley, J., Snyder, F., Brown, S. D., Brown, R. W., and Pond, B. B. Sex differences in the kinetic profiles of d-and l-methylphenidate in the brains of adult rats. **European Review for Medical and Pharmacological Science**, v. 19, p. 2514–2519, 2015.

BEVINS, R. A.; BESHEER, Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching- to-sample learning task to study ‘recognition memory’. **Nature protocols**, v.1, n.3, p.1306- 1311, 2006.

BERRIDGE, C.W.; DEVIBISS D.M. Psychostimulants as cognitive enhancers: the prefrontal cortex, catecholamines, and attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v.69; n.12, p. e101–e111, 2011.

BERRIDGE, C.W. DEVILBISS, D.M.; ANDRZEJEWSKI, M.E.; ARNSTEN, A.F.; KELLEY, A. E.; SCHMEICHEL, B.; HAMILTON, C.; SPENCER, R.C. Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. **Biological Psychiatry**, v. 60, n.10, p.1111–1120, 2006.

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

BIEDERMAN, J.; KWON, A.; ALEARDI, M.; CHOUINARD, V. A.; MARINO, T.; COLE, H. et al. Absence of gender effects on attention deficit hyperactivity disorder: findings in nonreferred subjects. **The American Journal Psychiatry**, v.162, p.1083–1089, 2005.

BIZOT, J.C., CHENAULT, N., HOUZÉ, B., HERPIN, A., DAVID, S., POTHION, S., TROVERO, F. Methylphenidate reduces impulsive behaviour in juvenile Wistar rats, but not in adult Wistar, SHR and WKY rats. **Psychopharmacology**, v.193, p. 215-223, 2007.

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

BRANDON, C. L.; MARINELLI, M.; BAKER, L.K.; WHITE, F.J. Enhanced reactivity and vulnerability to cocaine following methylphenidate treatment in adolescent rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, p. 651–661, 2001.

BRITTON, G.B.; BETHANCOURT, J.A. Characterization of anxiety-related responses in male rats following prolonged exposure to therapeutic doses of oral methylphenidate. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 93, 451–459, 2009.

BROWN, A. P.; DINGER, N.; LEVINE, B. S. Stress produced by gavage administration in the rat. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v.39, p.17–21, 2000.

BOLAÑOS, C.A.; BARROT, M.; BERTON, O.; WALLACE-BLACK, D.; NESTLER, E. J. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. **Biological Psychiatry**, v. 54, p. 1317–1329, 2003.

BULL, E.; REAVILL, C.; HAGAN, J.J.; OVEREND, P.; JONES, D.N. Evaluation of the spontaneously hypertensive rat as a model of attention deficit hyperactivity disorder: acquisition and performance of the DRL-60s test. **Behavioural Brain Research**, v. 109, p. 27–35, 2000.

BURKE, S.N.; WALLACE, J.L.; NEMATOLLAHI, S.; UPRETY, A.R.; BARNES, C. A. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. **Behavioral Neuroscience**, v.124, p.559–573, 2010.

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

BROWN, A. P.; DINGER, N.; LEVINE, B. S. Stress produced by gavage administration in the rat. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v.39, p.17–21, 2000.

CABALLERO, A.; TSENG, K.Y. A. GABAergic Function as a Limiting Factor for Prefrontal Maturation during Adolescence. **Trends in Neurosciences**, v. 39, p.441–448, 2016.

CARLEZON, W. A., JR.; THOMAS, M. J. Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 122-32, 2009.

CARLEZON, W.A.; MAGUE, S.D.; ANDERSEN, S.L. Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. **Biological Psychiatry**, v. 54, p. 1330–1337, 2003.

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

CAYE, T.B.; ROCHA, L.; ANSELM, J.; MURRAY, J.; MENEZES, F.C. et al. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder trajectories from childhood to young adulthood: evidence from a birth cohort supporting a late-onset syndrome. **JAMA Psychiatry**, v. 73, p. 705– 712, 2016.

Centers for Disease Control and Prevention, National Health and Nutrition Examination Survey.
<http://www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/datalink.htm>, 2007.

HEYSER, J.C.; PELLETIER, M.; FERRIS, J. The Effects of Methylphenidate on Novel Object Exploration in Weanling and Periadolescent Rats. **Annals Of The New York Academy of Sciences**, 1021: 465–469, 2004.

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

CHILDRESS, A.; TRAN, C. Current investigational drugs for the treatment of attention- deficit/hyperactivity disorder. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.25, p.463–474, 2016.

CHUHAN, Y.S.; TAUKULIS, H.K. Impairment of single-trial memory formation by oral methylphenidate in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.85, p.125–131, 2006.

COGHILL D.R.; RHODES S.M.; MATTHEWS K. The neuropsychological effects of chronic methylphenidate on drug-naïve boys with attention-deficit/hyperactivity. **Biological Psychiatry**, v.62, n.9, p. 954–962, 2007.

CONRAD, C. H. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. **Circulation**, v. 91, p. 161–170, 1995.

CORRÊA, F. J. **O cromossomo 4 influencia comportamentos relacionados à memória em um modelo genético de ratos.** Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, 2015.

CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1670-1672, 1999.

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

DE CRESCENZO, F.; CORTESE, S.; ADAMO, N.; JANIRI, L. Pharmacological and nonpharmacological treatment of adults with ADHD: a meta-review. **Evidence-Based Mental Health**, v.20, p.4–11, 2017.

DE MEDEIROS, G. F.; PEREIRA, E.; GRANZOTTO, N.; RAMOS, A. Low-Anxiety Rat Phenotypes Can Be Further Reduced through Genetic Intervention. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. 1-12, 2013.

DE SMET, H.J.; PAQUIER, P.; VERHOEVEN, J.; MARIEN, P. The cerebellum: its role in language and related cognitive and affective functions. **Brain and Language**, v.127, p. 334–342, 2013.

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

DODART, J.C.; MATHIS, C.; UNGERER, A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. **Neuroreport**, v. 8, n.5, p.1173-1178, 1997.

DONFRANCESCO, R., et al. Might the temperament be a bias in clinical study on attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) ? : Novelty Seeking dimension as a core feature of ADHD. **Psychiatry Research**, v. 227, p. 333-338, 2015.

DOUGHERTY, D. D.; BONAB, A.A.; SPENCER, T.J. et al. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. **Lancet**, v. 354, n. 9196, p. 18-25, Dec 18-25 1999.

ERSCHE, K.D.; STOCHL, J.; WOODWARD J.M.; FLETCHER, P. C. The skinny on cocaine: insights into eating behavior and body weight in cocaine-dependent men. **Appetite**, v. 71, p. 75–80, 2013.

FADANNI, P.G. **Efeitos comportamentais e neuroquímicos induzidos pela injeção bilateral de 6-hidroxidopamina no estriado de ratos das linhagens SHR e SLA16**. Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, 2018.

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

FARAONE, S. V.; BIEDERMAN, J.; MORLEY, C. P.; SPENCER, T. J. Effect of stimulants on height and weight: a review of the literature. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.47, p. 994–1009, 2008.

FARAONE, S. V.; ASHERSON, P.; BANASCHTEWSKI, T.; BIEDERMAN, J. et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 24, p. 489-500, 2015.

FAZAN, R.; DA SILVA,.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2001.

FERGUSON, S.A.; PAULE, M.G.; CADA, A.; FOGLE, C.M.; GRAY, E.P.; BERRY, K.J. Baseline behavior, but not sensitivity to stimulant drugs, differs among Spontaneously Hypertensive, Wistar-Kyoto, and Sprague-Dawley rat strains. **Neurotoxicology and Teratology**, v.29, p.547-561, 2007.

FERGUSON, S. A.; CADA, A.M. A longitudinal study of short- and long-term activity levels in male and female spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto, and Sprague-Dawley rats. **Behavioral Neuroscience**, v.117, n.2, p.271-282, 2003.

FIBIGER, H. C.; PHILLIPS, A. G. Mesocorticolimbic dopamine systems and reward. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 537, p. 206-215, 1988.

FINE, E.J.; LONITA, C.C.; LOHR, L. The history of the development of the cerebellar examination. **Seminars in Neurology**, v. 22, p. 375-384, 2002.

FIORILLO, C.D.; TOBLER, P.N.; SCHULTZ, W. Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. **Science**, v. 299, p. 1898-1902, 2003.

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

FONE, K. C.; NUTT, D.J. Stimulants: use and abuse in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. **Current Opinion Pharmacology**, v.5, p.87-93, 2005.

FUMAGALLI, F.; CATTANEO, A.; CAFFINO, L.; IBBA, M.; RACAGNI, G.; CARBONI, E.; GENNARELLI, M.; RIVA, M. A. Sub-chronic exposure to atomoxetine up-regulates BDNF expression and signalling in the brain of adolescent spontaneously hypertensive rats: comparison with methylphenidate. **Pharmacological Research**, v.62, p.523-529, 2010.

GALEANO, P.; ADAMI, V.P.; CARMO, S.; BLANCO, E.; ROTONDARO, C. *et al.* Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.8, p. 15-32, 2014.

GAUB, M.; CARLSON, C. L. Gender differences in ADHD: a meta-analysis and critical review. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.36, p.1036-1045, 1997.

GAYTAN, O.; GHELANI, D.; MARTIN, S.; SWANN, A.; DAFNY, N. Dose response characteristics of methylphenidate on different indices of rats' locomotor activity at the beginning of the dark cycle. **Brain Research**, v.727, p.13-21, 1996.

GAYTAN, O.; YANG, P.; SWANN, A.; DAFNY, N. Diurnal differences in sensitization to methylphenidate. **Brain Research**, n.864, p.24-39, 2000.

GOLLA, H.; THIER, P.; HAARMEIER, T. Disturbed overt but normal covert shifts of attention in adult cerebellar patients. **Brain: A Journal of Neurology**, v.128, p.1525-1535, 2005.

GERASIMOV, M.R.; FRANCESCHI, M.; VOLKOW, N.D.; GIFFORD, A.; GATLEY, S.J.; MARSTELLER, D.; MOLINA, P.E.; DEWEY, S.L. Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: a microdialysis and locomotor activity study. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 295, p. 51-57, 2000.

GERSHON, J.; GERSHON, J. A meta-analytic review of gender differences in ADHD. **Journal of Attention Disorders**, v.5, p.143-154, 2002.

GOLDMAN, L.S.; GENEL, M.; BEZMAN, R.J.; SLANETZ, P.J. Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs. **JAMA**, n. 279, v. 14, p.1100-1107, 1998.

GRANZOTTO, N. **Efeitos farmacogénéticos do tratamento com cafeína em ratos isogénicos SHR e SLA16**. Florianópolis: 2016.

GRAY, J.D.; PUNSONI, M.; TABORI, N. E.; MELTON, J. T.; FANSLow, V., WARD, M. J. *et al.* Methylphenidate administration to juvenile rats alters brain areas involved in cognition, motivated behaviors, appetite, and stress. **The Journal of Neuroscience**, v.27, p. 7196–7207, 2007.

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

HARD, E.; CARLSSON, S.G.; JERN, S.; LARSSON, K.; LINDH, A. S.; SVENSSON, L. Behavioral reactivity in spontaneously hypertensive rats. **Physiology & Behavior**, v.35, p.487–92, 1985.

HARVEY, R. C.; SEN, A.; DEACIUC, A.; DWOSKIN, L.; KANTAK, M. K. Methylphenidate Treatment in Adolescent Rats with an Attention Deficit/Hyperactivity Disorder Phenotype: Cocaine Addiction Vulnerability and Dopamine Transporter Function. **Neuropsychopharmacology**, v.36, p.837–847, 2011.

HEAL, D. J.; SMITH, S. L.; GOSDEN, J., Nutt, D.J. Amphetamine, past and present—a pharmacological and clinical perspective. **Journal of Psychopharmacology**, v.27, p.479–496, 2013.

HEYSER, C.J.; PELLETIER, M.; FERRIS, J.S. The effects of methylphenidate on novel object exploration in weanling and periadolescent rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1021, p. 465–469, 2004.

HIMELSTEIN, J.; NEWCORN, J. H.; HALPERIN, J. M. The neurobiology of attention- deficit hyperactivity disorder. **Frontier in Bioscience**, v. 5, p. D461-78, 2000.

HSU, C.H.; YANG, C.S.; PATEL, S.R.; STEVENS, M.G. Calcium and vitamin D metabolism in spontaneously hypertensive rats. **The American Journal of Physiology**, v.253, p.712- 723, 1987.

HUGHES, R. N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28, p.497–505, 2004.

IVANOV, I.; MURROUGH, J.W.; BANSAL, R.; HAO, X.; PETERSON, B.S. Cerebellar morphology and the effects of stimulant medications in youths with attention deficit- hyperactivity disorder. **Neuropsychopharmacology**, v.39, p.718–726, 2014.

IVRY, R.B.; SPENCER, R.M.; ZELAZNIK, H.N.; DIEDRICHSEN, J. The cerebellum and event timing. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.978, p.302–317, 2002.

IZENWASSER, S.; COY, A. E.; LADENHEIM, B.; LOELOFF, R. J.; CADET, J.L.; FRENCH, D. Chronic methylphenidate alters locomotor activity and dopamine transporters differently from cocaine. **European Journal of Pharmacology**, n. 373, p. 187–193, 1999.

IZIDIO, G. S.; LOPES, D.M.; RAMOS, A. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes, Brain and Behavior**, v. 4, n. 7, p. 412-419, 2005.

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

KAMIMURA, E.; UENO, Y.; TANAKA, S.; SAWA, H.; YOSHIOKA, M. *et al.* New rat model for attention deficit hyperactive disorder (ADHD). **Comparative Medicine**, v.51, p.245-51, 2001.

KANTAK, K. M.; SINGH, T.; KERSTETTER, K.A.; DEMBRO, K.A. *et al.* Advancing the spontaneous hypertensive rat model of attention deficit/hyperactivity disorder. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 340-57, 2008.

KESSLER, R.C.; ADLER, L.A.; BARKLEY, R.; BIEDERMAN, J. *et al.* Patterns and predictors of attentiondeficit/hyperactivity disorder persistence into adulthood: results from the national comorbidity survey replication. **Biological Psychiatry**, v.57; n.11, p.1442- 1451, 2005.

KESSLER, R.C.; KESSLER, R.C.; ADLER, L.A.; BARKLEY, R.; BIEDERMAN, J. *et al.* The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. **The American Journal of Psychiatry**, v.163, n.4, p.716-723, 2006.

KIANIFARD, D.; SHAPOUR, H.; KIANIFARD, L. The study of time dependent administration of methylphenidate on the microscopic indices of spermatogenesis and sperm analysis in adult rats. **Journal of Experimental and Integrative Medicine**, v.3, n.2, p.121-125, 2013.

KIELING, C.; KIELING, R.; ROHDE, A.L.; FRICK, P. *et al.* The age at onset of attention deficit hyperactivity disorder. **The American Journal of Psychiatry**, v. 167, n. 1, p. 14-6, 2010.

KILKENNY, C.; BROWNE, W. J.; CUTHILL, I. C.; EMERSON, M.; ALTMAN, D. G. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, v. 8, n. 6, e1000412. 2010.

KNARDAHL, S.; SAGVOLDEN, T. Open-field behavior of spontaneously hypertensive rats. **Behavioral and Neural Biology**, v.27, p.187–200, 1979.

KRAUSE, K. H.; DRESEL, S. H.; KRAUSE, J.; LA FOUGERE, C.; ACKENHEIL, M. The dopamine transporter and neuroimaging in attention deficit hyperactivity disorder. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 7, p. 605-13, 2003.

KUCZENSKI, R., SEGAL, D. S. Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.296, p.876–883, 2001.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S. Stimulant Actions in Rodents: Implications for Attention- Deficit/Hyperactivity Disorder Treatment and Potential Substance Abuse. **Biological Psychiatry**, v.57, p.1391–1396, 2005.

LAVALAYE, J.; BOOIJ, J.; RENEMAN, L.; HABRAKEN, J. B.; VAN ROVEN, E. A. Effect of age and gender on dopamine transporter imaging with [123I] FP-CIT SPET in healthy volunteers. **European Journal of Nuclear Medicine**, v.27, p.867–869, 2000.

LEBLANC-DUCHIN.; TAUKULIS, K.H. Chronic oral methylphenidate administration to periadolescent rats yields prolonged impairment of memory for objects. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.88, p.312–320, 2007.

MACKAY, T. F.; ANHOLT, R. R. Ain't misbehavin' ? Genotype-environment interactions and the genetics of behavior. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 7, p. 311-314, 2007.

MAGUE, S. D.; ANDERSEN, S. L.; CARLEZON, W. A. Early developmental exposure to methylphenidate reduces cocaine-induced potentiation of brain stimulation reward in rats. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 120–125, 2005.

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

MATE, L.; ANSELM, G.A.; SALUM, C.; KIELING, H.; GOLCALVES, A. et al. ADHD in DSM-5: a field trial in a large, representative sample of 18- to 19-year-old adults. **Psychological Medicine**, v.45, p.361–373, 2015.

MCCLEARN, G. E. Contextual genetics. **Trends Genetic**, v. 22, n. 6, p. 314-319, 2006.

MICK, E.; BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.V.; SAYER, J.; KLEINMAN, S. Case control study of attention deficit disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug using during pregnancy. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.41, n.4, p.378–384, 2002.

MILBERGER, S.; BIEDERMAN, J.; BERGER, S.; FARAONE, S.V.; JONES, J. Further evidence of an association between maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder: findings from a high-risk sample of siblings. **Journal of Clinical Child Psychology**, v.27, n.2, p.352–358, 1998.

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

MUELLER, K. Locomotor stereotypy is produced by methylphenidate and amfonelic acid and reduced by haloperidol but not clozapine or thioridazine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, n.45, p.71–76, 1993.

MUNRO, C. A.; McCAUL, M. E.; WONG, D. F.; OSWALD, L. M.; ZHOU, Y.; BRASIC, J. *et al.* Sex differences in striatal dopamine release in healthy adults. **Biological Psychiatry**, v.59, p.966–974, 2006

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

NEALE, B.M.; MEDLAND, S.E.; RIPKE, S.; ASHERSON, P.; FRANKE, B. *et al.* Meta- Analysis of Genome-Wide Association Studies of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.9, p.884-897, 2010

NEUMAN, R.J.; LOBOS, E.; REICH, W.; HENDERSON, C.A.; SUN, L.W.; TODD, R.D. Prenatal smoking exposure and dopaminergic genotypes interact to cause a severe ADHD subtype. **Biological Psychiatry**. v.61, p.1320–1328, 2007.

NIGG, J. T. Neuropsychologic theory and findings in attention-deficit/hyperactivity disorder: The state of the field and salient challenges for the coming decade. **Biological Psychiatry**, v.57, p.1424-1435, 2005.

OBINU, M.C.; REIBAUD, M.; MIQUET, J.M.; PASQUET, M.; ROONEY, T. Brain-selective stimulation of nicotinic receptors by TC-1734 enhances ACh transmission from frontoparietal cortex and memory in rodents. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v.26, n.5, p.913-918, 2002.

OLFSON, M.; MARCUS, S. C.; WEISSMAN, M. M.; JENSEN, P. S. National trends in the use of psychotropic medications by children. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.41, p.514–521, 2002.

PARE, W.P. Stress ulcer and open-field behavior of spontaneously hypertensive, normotensive, and Wistar rats. **The Pavlovian Journal of Biological Science**, v.24, p.54– 57, 1989.

PARK, H.; SUH, B. S.; LEE, H.K.; LEE. K. Temperament and characteristics related to attention deficit/hyperactivity disorder symptoms. **Comprehensive Psychiatry**, v.70, p.112-117, 2016.

PATRICK, K.; STRAUGHN, A.; MINHINNETT, R.; YEATTS, S.; HERRIN, A. *et al.* Influence of ethanol and gender on methylphenidate pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 81, p. 346–353, 2007.

PÉRTILE, N.A.R.; CORVINO, M.E.; MARCHETTE, N.C.R.; PAVESI, E.; CAVALLI, J.; RAMOS, A.; IZÍDIO, S.G. The Quinpirole Hypolocomotive Effects are Strain and Route of Administration Dependent in SHR and SLA16 Isogenic Rats. **Behavior Genetics**, v.5, p. 552-563, 2017.

PETRY, A. Hiperatividade: Características e procedimentos básicos para amenizar as dificuldades. **Professor**, Porto Alegre. Abril, p.47-48, 1999.

PIETRZAK, R.H.; MOLLICA, C. M.; MARUFF, P.; SNYDER, P. Cognitive effects of immediate release methylphenidate in children with attention deficit/hyperactivity disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.30, p.1225–1245, 2006.

POHJALAINEN, T.; RINNE, J. O.; NAGREN, K.; SYVALAHTI, E.; HIETALA, J. Sex differences in the striatal dopamine D2 receptor binding characteristics in vivo. **The American Journal of Psychiatry**, v.155, p.768–773, 1998.

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

QUANSAH, E.; SPAMMA, T.; JADDOA, E.; ZETTERSTROM, T.S.C. Chronic methylphenidate regulates genes and proteins mediating neuroplasticity in the juvenile rat brain. **Neuroscience Letters**, v.654, p.93–98, 2007.

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

RAMOS, A.; MOISAN, M.P.; CHAOULOFF, F.; MORMÈDE, C.; MORMÈDE, P. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular Psychiatry**, v. 4, n. 5, p. 453-462. 1999.

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

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

REYNOLDS, L. M.; MAKOWSKI, C. S.; YOGENDRAN, S. V. et al. Amphetamine in adolescence disrupts the development of medial prefrontal cortex dopamine connectivity in a dcc-dependent manner. **Neuropsychopharmacology**, v.40, p.1101–1112, 2015.

RHODES, S.M.; COGHILL, D.R.; MATTHEWS, K. Acute neuropsychological effects of methylphenidate in stimulant drug-naïve boys with ADHD II—broader executive and non- executive domains. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, v. 47, n.11, p.1184–1194, 2006.

RIGLER, T.; MANOR, I.; KALANSKY, A.; SHORER, Z.; NOYMAN, I.; SADAKA, Y. New DSM-5 criteria for ADHD-does it matter? **Comprehensive Psychiatry**, v. 68, p. 56– 59, 2016.

ROBISON, L.M.; SCLAR, D.A.; SKAER, T.L.; GALIN, R.S. National trends in the prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder and the prescribing of methylphenidate among school-age children: 1990–1995. **Clinical Pediatrics**, v.38, n.4, p.209–217, 1999.

ROBISON, L.; MICHAELOS, M.; GANDHI, J.; FRICKE, D.; MIAO, E.; *et al.* Sex Differences in the Physiological and Behavioral Effects of Chronic Oral Methylphenidate Treatment in Rats. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.11, p. 53, 2017.

ROBINSON, T.E.; KOLB, B. Kolb B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. **Neuropharmacology**, v.47, p.33–46, 2004.

ROBINSON, T.E. Behavioral sensitization: characterization of enduring changes in rotational behavior produced by intermittent injections of amphetamine in male and female rats. **Psychopharmacology**, v.84, p.466–475, 1984.

ROESSNER, V.; SAGVOLDEN, T.; DASBANERJEE, T.; MIDDLETON, F.A. *et al.* Methylphenidate normalizes elevated dopamine transporter densities in an animal model of the attention-deficit/hyperactivity disorder combined type, but not to the same extent in one of the attentiondeficit/hyperactivity disorder inattentive type. **Neuroscience**, v.167, n.4, p.1183-1191, 2010.

ROMANOS, M.; WEISE, D.; SCHLIESSER, M.; SCHECKLMANN, M. *et al.* Structural abnormality of the substantia nigra in children with attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 35, n. 1, p. 55-8, 2010.

ROMMELSE, N.N.; ALTINK, M.E.; FLIERS, E.A.; MARTIN, N.C.; BUSCHGENS, C.J. *et al.* Comorbid problems in ADHD: degree of association, shared endophenotypes, and formation of distinct subtypes. Implications for a future DSM. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v.37, p.793–804, 2009.

ROMEO, R. Puberty: A period of both organizational and activational effects of steroid hormones on neurobehavioural development. **Journal of Neuroendocrinology**, v.15, p.1185–1192, 2003.

RUSSELL, V. A. Increased AMPA receptor function in slices containing the prefrontal cortex of spontaneously hypertensive rats. **Metabolic Brain Disease**, v.16, n.3-4, p.143-9, 2001.

RUSSELL, V. A.; OADES, R. D.; TANNOCK, R.; KILLEEN, P.R. *et al.* Response variability in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: A neuronal and glial energetics hypothesis. **Behavioral and Brain Functions**, v.2, p.20-30, 2006.

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

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

SAGVOLDEN, T.; RUSSEL, V.A.; AASE, H.; JOHANSEN, E. B.; FARSHBAF, M. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v.57, p.1239–1247, 2005.

SAGVOLDEN, T.; SERGEANT, J.A. Attention deficit/hyperactivity disorder--from brain dysfunctions to behaviour. **Behavioral Brain Research**, v.94, n.1, p.1–10, 1998.

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

SAGVOLDEN, T.; PETERSEN, M.B.; LARSEN, M. C. Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesis: SHR behavior compared to four other rat strains. **Physiology & Behavior**, v.54, p.1047–55, 1993.

SAGVOLDEN, T.; JOHANSEN, E.B.; WOIEN, G.; WALAAS, S.I. *et al.* The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 7-8, p. 619-626, 2009.

SARTER, M.; HAGAN, J.; DUDCHENKO, P. Behavioral screening for cognition enhancers: From indiscriminate to valid testing: Part I. **Psychopharmacology**, v.107, p.144–159, 1992.

SARTER M., BODEWITZ G., STEPHENS D.N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta- carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94, p.491–495, 1988.

SCHMAHMANN, J.D.; SHERMAN, J.C. The cerebellar cognitive affective syndrome. **Brain: A Journal of Neurology**, v.121, p.561–579, 1998.

SCHMITZ, M.; DENARDIN, D.; LAUFER, T.; PIANCA, T.; HUTZ, M.; FARAONE, S.; ROHDE, L.A. Smoking During Pregnancy and Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder, Predominantly Inattentive Type: A Case-Control Study. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.45, p.1338-1345, 2006.

SCHNEIDER, B.F.; NORTON, B, F.; NORTON, S. Circadian and sex differences in hyperactivity produced by amphetamine in rats. **Physiology Behavior**, v.22, p.47–51, 1979.

SCHULTZ, W. Predictive reward signal of dopamine neurons. **Journal of Neurophysiology**, v.80, p.1-27, 1998.

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

SHEN, H. L.; LIAO, H.M.; TSENG, C.Y. Recent Advances in Imaging of Dopaminergic Neurons for Evaluation of Neuropsychiatric Disorders. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.345-366, 2012.

SHIBATA, H.; GHISHAN, F.K. Intestinal calcium transport in spontaneously hypertensive rats (SHR) and their genetically matched WKY rats. **Experimental Biology and Medicine**, v.194, p. 26-31, 1990.

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

SISK, C. L.; ZEHR, J. L. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.26, p.163–174, 2005.

SKOGLI, M. H.; TEICHER, P. N.; ANDERSEN, K. T.; HOVIK, M. ADHD in girls and boys--gender differences in co-existing symptoms and executive function measures. **BMC Psychiatry**, v. 13, p. 213-298, 2013.

SOMKUWAR, S.S.; KANTAK, M. K.; BARDO, M.T.; DWOSKIN, L.P. Adolescent methylphenidate treatment differentially alters adult impulsivity and hyperactivity in the Spontaneously Hypertensive Rat model of ADHD. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.141, p.66-77, 2016

SONTAG, T.A.; TUCHA, O.; WALITZA, S.; LANGE, K.W. Animal models of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a critical review. **Attention Deficit Hyperactivity Disorders**, v.2, p.1–20, 2010.

SPIVEY, J.; COLORADO, R.A.; CONEJO, N.M.; GONZALEZ-PARDO, H.; GONZALEZ-LIMA, F. Juvenile male rats display lower cortical metabolic capacity than females. **Neuroscience Letters**, v.440, p.255–259, 2008.

STALEY, J. K.; KRISHNAN-SARIN, S.; ZOGHBI, S.; TAMAGNAN, G.; FUJITA, M.; SEIBVL, J. P. *et al.* Sex differences in [123I] β -CIT SPECT measures of dopamine and serotonin transporter availability in healthy smokers and nonsmokers. **Synapse**, v.41, p.275–284, 2001.

STANWOOD, G. D.; LEVITT, P. Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. **Current Opinion in Pharmacology**, v.4, p.65–71, 2004.

STEINBERG, L. A Social Neuroscience Perspective on Adolescent Risk Taking. **Developmental Review**, v.28, n.1, p.78-106, 2008.

STEINLIN, M. Cerebellar disorders in childhood: cognitive problems. **Cerebellum**, v.7, p.607–610, 2008.

STOFF, D. M.; FRIEDMAN, E.; POLLOCK, L.; VITIELLO, B. et al. Elevated platelet MAO is related to impulsivity in disruptive behavior disorders. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.28, n. 5, p. 754-60, 1989.

STOODLEY, C.J.; VALERA, E.M.; SCHMAHMANN, J.D. Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: an fMRI study. **Neuroimage**, v.59, p.1560–1570, 2012.

SWANSON, J.M. et al. Attention-deficit/hyperactivity disorders:symptom domains, cognitive processes and neural networks. **In: . Parasuraman R.** The Attentive Brain: MIT Press, Cambridge, MA, p. 445-460, 1998.

SWANSON, J. M.; VOLKOW, N. D. Increasing use of stimulants warns of potential abuse. **Nature**, v.453, p.586, 2008.

TANNOCK, R. Attention-deficit/hyperactivity disorder: advances in cognitive, neurobiological, and genetic research. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v.39, p. 65-99,1998.

THANOS, P.K.; MICHAELIDES, M.; BENVENISTE, H.; WANG, G.J.; VOLKOW, N.D. Effects of chronic oral methylphenidate on cocaine self-administration and striatal dopamine D2 receptors in rodents. **Pharmacology and Biochemistry and Behavior**, v.87, p.426–433, 2007.

THANOS, P. K.; ROBISON, L. S.; STEIER, J.; HWANG, Y. F.; COOPER, T.; SWANSON, J. M. *et al.* A pharmacokinetic model of oral methylphenidate in the rat and effects on behavior. **Pharmacology and Biochemistry and Behavior**, v.131, p.143–153, 2015.

THAPAR, A.; FOWLER, T.; RICE, F.; SCOURFIELD, J Rice F.; VAN DEN BREE, M.; THOMAS, H. *et al.* Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring. **The American Journal of Psychiatry**, v.160, n.11, p.1985–1989, 2003.

THAPAR, A.; HOLMES, J.; POULTON, K.; HARREINGTON, R. Genetic basis of attention-deficit and hyperactivity. **Journal of Psychiatry**, v.174, p.105-111, 1999.

TINGEN, C. M.; KIM, A. M.; WU, P. H.; WOODRUFF, T. K. Sex and sensitivity: the continued need for sex-based biomedical research and implementation. **Women's Health**. v.6, p.511–516, 2010.

TOLMAN, E.C. Purpose and cognition: the determiners of animal learning. **Psychological Review**, v.32, p.285–297, 1925.

TOSTO, G. M.; MOMI, K. S.; ASHERSON, P.; MALKI, K. A systematic review of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and mathematical ability: current findings and future implications. **BMC Medicine**, v.13, p.204-209, 2015.

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

URBAN, K. R.; GAO, W. J. Evolution of the study of methylphenidate and its actions on the adult versus juvenile brain. **Journal of Attention Disorders**, v.19, p. 603–619, 2015.

VALERA, E.M.; FARAONE, S.V.; MURRAY, K.E.; SEIDMAN, L.J. Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v.61, p.1361–1369, 2007.

VALVASSORI, S.S.; FREY, B.N.; MARTINS, M.R.; REUS, G. Z.; SCHIMIDTZ, F.; INACIO, C. G, *et al.* Sensitization and cross-sensitization after chronic treatment with methylphenidate in adolescent Wistar rats. **Behavioural Pharmacology**, v.18, p.205–212, 2007.

VAN DEN BERGH, F.S.; BLOEMANTS, E.; CHAN, J.S.; GROENINK, L.; OLIVIER, B.; OOSTING, R.S. Spontaneously hypertensive rats do not predict symptoms of attention-deficit hypertensive disorder. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.83, p.380-390, 2006.

VAN DER MAREL, K.; KLOMP, A.; MEERHOFF, G.; SCHIPPER, P.; LUCASSEN, P. *et al.* Long-Term Oral Methylphenidate Treatment in Adolescent and Adult Rats: Differential Effects on Brain Morphology and Function. **Neuropsychopharmacology**, v.39, p.263-273, 2014.

VANINA, Y.; PODOLSKAYA, A.; SEDKY, K.; SHAHAB, H.; SIDDIQUI, A.; MUNSHI, F., *et al.* Body weight changes associated with psychopharmacology. **Psychiatric Services**, v.53, p.842-847, 2002.

VENDRUSCOLO, L.F.; IZÍDIO, G.S.; TAKAHASHI, R. N.; RAMOS, A. Chronic methylphenidate treatment during adolescence increases anxiety-related behaviors and ethanol drinking in adult Spontaneously Hypertensive Rats. **Behavioral Pharmacologic**, v.19, p. 21-27, 2008.

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

VILLANUEVA, R. The cerebellum and neuropsychiatric disorders. **Psychiatry Research**, v.198, p.527-532, 2012.

VOLKOW, N.D.; INSEL, T.R. What are the long-term effects of methylphenidate treatment? **Biological Psychiatry**, v. 15, p.1307-1309, 2003.

VOLKON, N.D.; SWANSON, J.M. Variables that affect the clinical use and abuse of methylphenidate in the treatment of ADHD. **The American Journal of Psychiatry**, v. 160, n.11, p.1909-1918, 2013.

ZAKHAROVA, E.; WADE, D.; IZENWASSER, S. Sensitivity to cocaine conditioned reward depends on sex and age. **Pharmacology Biochemistry, and Behavior**, v.92, p.131-134, 2009.

ZHU, N.; WEEDON, J.; DOW-EDWARDS, D.L. The multifaceted

effects of oral administration of methylphenidate in juvenile rats: anxiety, activity, and attention. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, p. 236–244, 2010.

WAHLSTEN, D.; BACHMANOV, A.; FINN, D.A.; CRABBE, J.C. Stability of inbred mouse strain differences in behavior and brain size between laboratories and across decades. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 44, p.16364-16369, 2006.

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

WEISSENBERGER, A.A.; LESCHEK, E.W.; ZAMETKIN, A. J. Case study: Sexual hyperactivity treated with psychostimulants in familial male precocious puberty. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v. 40, p.373–376, 2001.

WENDY, J.; ARIZZI, M.; CARROLL, M. Effects of sex and the estrous cycle on regulation of intravenously self-administered cocaine in rats. **Psychopharmacology**, v.152, p.132–139, 2000.

WILLCUTT, E. G.; DOYLE, A. E.; NIGG, J. T., FARAONE, S. V.; & Pennington, B. F. Validity of the executive function theory of attention-deficit/hyperactivity disorder: A meta-analytic review. **Biological Psychiatry**, v.57, p.1336-1346, 2005.

WILLIAMSON, D.; JOHNSTON, C. Gender differences in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: A narrative review. **Clinical Psychology Review**, v. 40, p. 15–27, 2015.

WILEY, M.D.; POVEROMO, L. B.; ANTAPASIS, J.; HERRERA, C.M.; BOLANOS GUZMAN, C.A. Kappa-opioid system regulates the long-lasting behavioral adaptations induced by early-life exposure to methylphenidate. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p.1339–50, 2009.

WINTERSTEIN, A.G.; GERHARD, T.; SHUSTER, J. Cardiac Safety of Methylphenidate Versus Amphetamine Salts in the Treatment of ADHD. **Pediatrics**, v.124, p. 31-38, 2009.

WULTZ, B.; SAGVOLDEN, T.; MOSER, E.L.; MOSER, M.B. The spontaneously hypertensive rat as an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate on exploratory behavior. **Behavioral and Neural Biology**, v.53, p.88–102, 1990.