

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

AMANDA STALDONI ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM  
AMBOS OS SEXOS DE RATOS PRÉ-PÚBERES DE UM MODELO DO TRANSTORNO  
DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE**

Porto Alegre

2017

AMANDA STALDONI ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM  
AMBOS OS SEXOS DE RATOS PRÉ-PÚBERES DE UM MODELO DO TRANSTORNO  
DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Área de habilitação: Bioquímica

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lisiane de Oliveira Porciúncula

Porto Alegre

2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Almeida, Amanda Staldoni

Avaliação de parâmetros neuroquímicos e comportamentais em ambos os sexos de ratos pré-púberes de um modelo do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade / Amanda Staldoni Almeida. -- 2017.

65 f.

Orientadora: Lisiane de Oliveira Porciúncula.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. TDAH. 2. Ratos espontaneamente hipertensos. 3. Diferenças de sexo. 4. Infância. I. Porciúncula, Lisiane de Oliveira, orient. II. Título.

AMANDA STALDONI ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM  
AMBOS OS SEXOS DE RATOS PRÉ-PÚBERES DE UM MODELO DO TRANSTORNO  
DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 23 de junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr<sup>a</sup>. Daniela Pochmann - IPA

---

Dr. Roberto Farina de Almeida - UFRGS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lisiane de Oliveira Porciúncula – UFRGS (orientadora)

## RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns do desenvolvimento, afetando cerca de 3,4% das crianças e adolescentes e 2,8% dos adultos no mundo. A tríade sintomática do TDAH é caracterizada pela desatenção, hiperatividade e impulsividade, sendo que nos meninos com o transtorno prevalece o subtipo impulsivo e hiperativo, enquanto que nas meninas a desatenção é o sintoma mais evidente. Os meninos são mais diagnosticados com TDAH do que as meninas em uma proporção de 2,28:1, sendo que uma possível explicação para esse diagnóstico diferencial está na dificuldade de identificação da desatenção das meninas com o transtorno. Além disso, estudos de neuroimagem já revelaram que os pacientes com TDAH apresentam um processo de maturação do sistema nervoso central (SNC) mais lento do que pessoas sem o transtorno. Duas proteínas importantes no desenvolvimento e funcionamento do SNC são a SHH (do inglês *Sonic Hedgehog*) e Proteína Associada ao Crescimento 43 (GAP-43, do inglês *Growth Associated Protein 43*), sendo que alterações nas suas expressões já foram identificadas em distúrbios neurológicos, como, autismo e esquizofrenia. A linhagem dos ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) é um dos modelos animais mais validados para os estudos sobre o TDAH. Embora na vida adulta os animais SHR manifestem hipertensão, durante a infância e adolescência eles apresentam as principais características do transtorno, tais como, desatenção, impulsividade e hiperatividade. Com base nas diferenças de gênero e nas alterações no desenvolvimento do SNC nesse transtorno, torna-se importante analisar parâmetros comportamentais e neuroquímicos durante infância de animais modelo do TDAH. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão de imunoproteína das proteínas SHH e GAP-43 e investigar aspectos comportamentais durante a infância em ambos os sexos dos animais SHR comparados com os animais controles Wistar Kyoto (WKY). Quanto aos testes comportamentais, realizou-se o teste de preferência pelo odor materno no 8º dia pós-natal (DPN) dos animais e o teste de preferência pelo objeto novo no 22º DPN em ambos os sexos e linhagens. Nos mesmos dias pós-natais, o conteúdo das proteínas SHH e GAP-43 foram analisados pela técnica de *Western blot* no hipocampo, no córtex pré-frontal e no bulbo olfatório de ambos os sexos e linhagens. No modelo animal do TDAH, somente as fêmeas apresentaram um prejuízo cognitivo em ambos os testes comportamentais durante a infância. Observou-se um aumento no conteúdo da SHH no 22º DPN em comparação com o 8º DPN no hipocampo de ambas as linhagens e sexos, enquanto que a GAP-43 aumentou no bulbo olfatório e no córtex pré-frontal em ambos os sexos e linhagens. Contudo, os níveis da GAP-43 nessas duas regiões, não aumentaram nos SHR tanto quanto nos WKY. Portanto, foi possível identificar prejuízos cognitivos e diferenças entre os sexos em idades precoces nos animais modelo do TDAH. Enquanto as alterações observadas no conteúdo das proteínas SHH e GAP-43 também podem estar envolvidas no desenvolvimento do transtorno e contribuem para um melhor entendimento das bases neurobiológicas do TDAH.

Palavras-chave: TDAH. Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR). Infância. Diferenças de sexo. GAP-43. SHH.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação entre o desenvolvimento do SNC entre roedores e humanos....	11
Figura 2 - Desenho Experimental ilustrado do estudo.....	21
Figura 3 – Desempenho de ambos os sexos dos animais WKY e SHR no teste de preferência pelo odor materno.....	23
Figura 4 – Desempenho de ambos os sexos dos animais WKY e SHR na habituação ao aparato do teste de reconhecimento de objeto novo no primeiro dia de experimento.....	24
Figura 5 – Desempenho de ambos os sexos dos animais WKY e SHR na habituação ao aparato do teste de reconhecimento de objeto novo no segundo dia de experimento.....	25
Figura 6 – Exploração total em ambos os objetos na sessão de treino.....	26
Figura 7 – Exploração dos objetos na sessão de teste pelos animais WKY e SHR de ambos os sexos no teste de reconhecimento de objeto novo.....	27
Figura 8 – Imunoconteúdo da SHH no bulbo olfatório dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal.....	28
Figura 9 – Imunoconteúdo da GAP-43 no bulbo olfatório dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal.....	29
Figura 10 – Imunoconteúdo da SHH no córtex pré-frontal dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal.....	30
Figura 11 – Imunoconteúdo da GAP-43 no córtex pré-frontal dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal.....	31
Figura 12 – Imunoconteúdo da SHH no hipocampo dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal.....	32
Figura 13 - Imunoconteúdo da GAP-43 no hipocampo dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal.....	33

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA .....</b>	<b>7</b>
1.1 TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH) .....	7
1.1.1 Etiologia.....	7
1.1.2 Sintomas e diferenças de gênero.....	8
1.1.3 Diagnóstico e tratamento .....	8
1.1.4 Modelo Animal.....	9
1.1.5 Desenvolvimento do sistema nervoso central – Comparação entre humanos e roedores	10
1.1.5.1 Sonic Hedhehog.....	12
1.1.5.2 GAP-43.....	12
1.2 JUSTIFICATIVA .....	14
1.3 OBJETIVO .....	15
<b>1.3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>2. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>16</b>
<b>3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO I – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH.....</b>	<b>50</b>

## **1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA**

### **1.1 TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH)**

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é uma desordem psiquiátrica do desenvolvimento caracterizada primordialmente pelos sintomas da desatenção, hiperatividade e impulsividade, prevalecendo em cerca de 3,4% das crianças e adolescentes no mundo (POLANCZYK et al., 2015). Entretanto, esse não é um transtorno exclusivo do desenvolvimento, visto que cerca de 65% das crianças diagnosticadas persistem com o transtorno até a vida adulta (FARAONE, et al., 2006). Nos adultos, a prevalência do TDAH é cerca de 2,8% (FAYYAD et al., 2017).

A sintomatologia do TDAH é influenciada pelo gênero do paciente, as meninas apresentam um subtipo onde predomina a desatenção enquanto que os meninos manifestam de forma mais robusta a hiperatividade e a impulsividade (BIEDERMAN et al., 2002). Como o TDAH é frequentemente mais diagnosticado nos meninos do que nas meninas, numa proporção de 2,28 : 1 (RAMTEKKAR et al., 2010), uma possível explicação para esse diagnóstico diferencial reside na maior facilidade de identificação dos sintomas da hiperatividade e impulsividade que são mais evidentes nos meninos, enquanto que o predomínio da desatenção nas meninas dificulta o diagnóstico do TDAH nas pacientes do sexo feminino (BIEDERMAN et al., 2002).

#### **1.1.1 Etiologia**

A base etiológica do TDAH é complexa e multifatorial, onde tanto fatores ambientais como genéticos contribuem para o desenvolvimento do transtorno. A transmissão genética do TDAH familiar é um dos componentes etiológicos mais importantes e evidencia a alta heritabilidade do transtorno (75%) (BIEDERMAN; FARAONE, 2005). Dentre os fatores que contribuem para o risco de desenvolver o TDHA estão o parto prematuro, o baixo peso ao nascer, as complicações no parto (HALMØY et al., 2012; SILVA et al., 2014; HENRIKSEN et al., 2015), o uso de álcool e tabaco durante a gravidez (LANGLEY et al., 2012; SILVA et al., 2014). As adversidades psicossociais tais como: discórdia conjugal, classe social baixa, tamanho familiar, criminalidade paterna e desordem mental materna também aumentam as chances de desenvolvimento do transtorno (BIEDERMAN; FARAONE; MONUTEAUX, 2002).

A hipofunção dopaminérgica também se enquadra nas bases neurobiológicas do TDAH. Os estudos de neuroimagem já revelaram reduções no volume de diversas regiões encefálicas que incluem as áreas de sinalização dopaminérgica, tais como: as áreas frontocor-



ticoestriais, os gânglios da base, a amígdala, o hipocampo, o tálamo, o cerebelo e os lobos temporo parietais (CASTELLANOS, F. X. et al., 2002; SHAW, P. et al., 2006; VALERA et al., 2007; CORTESE, 2012;). Os modelos animais com disfunções dopaminérgicas, polimorfismos no transportador de dopamina (DAT) e nos receptores de dopamina também evidenciam a hipofunção dopaminérgica como base do transtorno (GENRO et al., 2010). Além disso, a alta eficiência do tratamento com psicoestimulantes, como o metilfenidato, um inibidor do transporte de dopamina na pré-sinapse via DAT (VOLKOW et al., 2002), contribui para evidenciar o papel crucial da dopamina no TDAH (GENRO et al., 2010).

### 1.1.2 Sintomas e diferenças de gênero

O TDAH é caracterizado pela impulsividade, hiperatividade e déficit de atenção, ou uma combinação desses sintomas de acordo com o DSM-5 (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição). Os sintomas geralmente são identificados pelos pais antes do paciente completar 5 anos de idade (NØVIK et al., 2006). No entanto, a sintomatologia pode ser influenciada conforme o gênero, visto que nas meninas diagnosticadas prevalece o subtipo desatento, enquanto que nos meninos predomina a combinação entre a impulsividade e a hiperatividade. Durante o período escolar os meninos apresentam maiores prejuízos no convívio social e na aprendizagem do que as meninas. (BIEDERMAN et al., 2002). Além disso, uma grande proporção de crianças com TDAH participam de episódios de *bullying* na escola, sendo que as meninas normalmente estão mais envolvidas como vítimas da situação, enquanto que os meninos com transtorno praticam mais o ato do *bullying* por si só (NØVIK et al., 2006).

Além disso, o TDAH frequentemente é acompanhado de outras comorbidades como distúrbios primários de leitura e aprendizagem, transtorno opositivo-desafiador, ansiedade, depressão e dificuldades de coordenação (WOLRAICH et al., 2011). O autismo, a síndrome do X frágil, a epilepsia, a injúria cerebral traumática, a síndrome de Tourette e os distúrbios do sono também podem acompanhar os pacientes com TDAH (FELDMAN; REIFF, 2014). Por outro lado, os adultos com TDAH tendem a ter menor grau educacional, menor sucesso vocacional, prejuízo social e menor cuidado pessoal comparado com pessoas sem o transtorno (KESSLER et al., 2006; BARKLEY et al., 2008; MANNUZZA et al., 2011). As mulheres adultas diagnosticadas com TDAH apresentam maiores chances de desenvolver durante a vida transtornos de ansiedade, depressão, sintomas somáticos e bulimia quando comparadas aos homens com o mesmo transtorno. Enquanto que os pacientes do sexo masculino se expõem com

mais frequência a comportamentos de risco, abuso de substâncias ilícitas, alcoolismo, além de transtornos de conduta e de personalidade (WILLIAMSON; JOHNSTON, 2015).

### **1.1.3 Diagnóstico e tratamento**

Embora os estudos estejam aprofundando o conhecimento sobre as bases neurobiológicas do TDAH a nível mundial, não há ainda nenhum biomarcador do transtorno, o que restringe o diagnóstico somente a observação dos sintomas clínicos. Como os sintomas do TDAH são evidenciados durante o desenvolvimento normal das crianças e adolescentes (hiperatividade, desatenção e impulsividade), o diagnóstico do transtorno deve priorizar a identificação desses sintomas quando eles se apresentam de maneira exacerbada e persistente, e que também não se adequam ao comportamento normal da idade. Portanto, os critérios utilizados atualmente para diagnóstico de TDAH baseiam-se no DSM-5 (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais), da Associação Americana de Psiquiatria Americana (APA, 2013) e na CID-10 (Classificação Internacional de Doenças), da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1992). No caso de pacientes em idade escolar, as informações sobre o comportamento para auxiliar no diagnóstico são fornecidas pelas pessoas que convivem diariamente com a criança, normalmente os pais ou responsáveis e os professores. Na população adolescente e adulta o auto-relato é um elemento adicional importante na identificação do TDAH (FELDMAN; REIFF, 2014).

Os pais de crianças com TDAH normalmente buscam o primeiro tratamento quando os pacientes apresentam cerca de 7 anos de idade (NØVIK et al., 2006). O tratamento para o TDAH não se limita a intervenções farmacológicas, mas também necessita de uma colaboração entre os profissionais de saúde, os educadores, o paciente e a sua família para realizar o tratamento de forma conjunta e coordenada à longo prazo (WOLRAICH et al., 2011). Quanto aos medicamentos, os psicoestimulantes, como o metilfenidato e a anfetamina são a primeira escolha de tratamento farmacológico para o TDAH. O metilfenidato é o medicamento mais utilizado, sendo que cerca de 70% das crianças diagnosticadas respondem bem ao seu tratamento e reduzem em 50% os sintomas do TDAH. O metilfenidato atua inibindo o transportador de dopamina (DAT) promovendo o aumento desse neurotransmissor na fenda sináptica (GENRO et al., 2010). As formulações para a liberação lenta ou sustentada desses medicamentos são as mais indicadas do que as de liberação rápida e curta, pois garantem que o efeito do psicoestimulante perdure durante todo o dia, amenizando os sintomas durante o horário escolar e reduzindo os efeitos adversos mais comuns, como, a perda do apetite e perturbações do sono. A atomexitina que é um inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina, a guanfa-

cina e a clonidina, agonistas seletivos do receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico também podem ser utilizados no tratamento do TDAH, porém os seus efeitos não são tão potentes quando comparados aos dos psicoestimulantes (FELDMAN; REIFF, 2014).

#### **1.1.4 Modelo Animal**

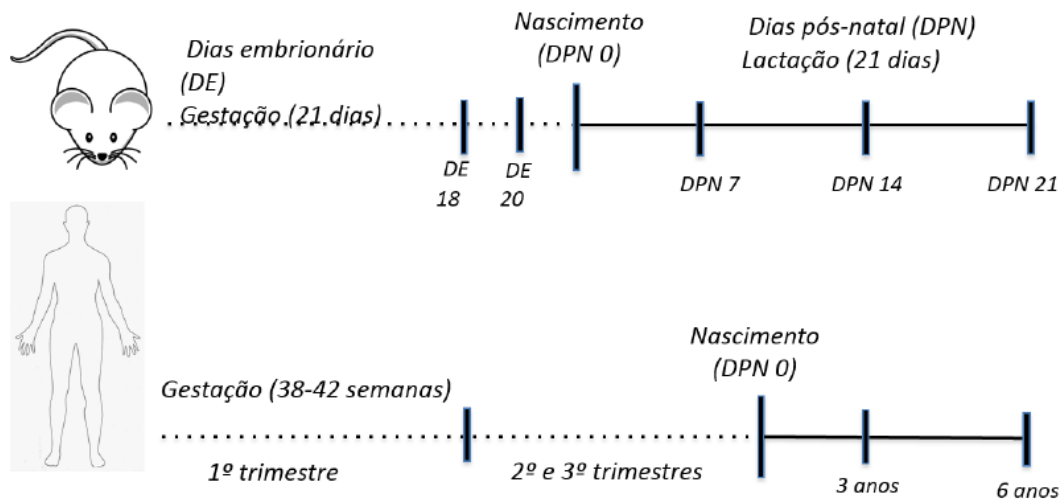
Os modelos animais são muito úteis nas pesquisas biomédicas devido a facilidade de analisar o seu sistema nervoso central, o seu comportamento e controlar a sua exposição ao ambiente, além de possibilitar a realização de diversas intervenções. Isso é particularmente relevante em estudos sobre distúrbios do desenvolvimento, pois ao contrário de outras desordens psiquiátricas, não há bancos de amostras de tecido cerebral. Assim, já foram desenvolvidos alguns modelos animais para o estudo do TDAH, que incluem os ratos Naple com alta excitabilidade, os camundongos nocaute para o transportador de dopamina e os camundongos mutantes coloboma (nocaute no gene SNAP-25), que embora sejam úteis em algumas abordagens, esses animais não preenchem os três critérios mais utilizados para determinar a validade de modelo animal (SAGVOLDEN et al., 2005).

De fato, os únicos animais que apresentam a validade de face, construto e preditiva são os ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) (SAGVOLDEN et al., 2005) e, portanto, são o modelo animal mais utilizado nos estudos sobre o TDAH. Esse modelo foi originado a partir de ratos progenitores Wistar Kyoto (WKY) em 1963 no Japão (OKAMOTO; AOKI, 1963). Na vida adulta, os animais SHR desenvolvem hipertensão, sendo úteis em estudos cardiovasculares (TAYEBATI et al., 2012). No entanto, durante a infância e adolescência, esses animais apresentam impulsividade, hiperatividade e desatenção, características fundamentais do TDAH preenchendo a validade de face do modelo. Como validade de construto, os ratos SHR apresentam disfunções dopaminérgicas em regiões mesolímbicas, mesocorticais e nigroestriatais. Por fim, os SHR também respondem adequadamente ao tratamento com metilfenidato prevendo correlatos de TDAH em seres humanos no que se refere ao comportamento, a genética e as funções neuronais ainda não mostrados na prática clínica, preenchendo o critério de validade preditiva (SAGVOLDEN et al., 2005, 2009; SIMCHON et al., 2010).

#### **1.1.5 Desenvolvimento do sistema nervoso central – Comparação entre humanos e roedores**

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) depende interação entre fatores genéticos e estímulos externos, o qual estendem desde da vida uterina até a vida adulta. Sim-

plificadamente, o processo de desenvolvimento do SNC envolve a transformação de estruturas imaturas e ineficientes em estruturas maduras e eficientes (EL-SAYED et al., 2007). Comparando o processo de amadurecimento do SNC entre roedores e humanos, quanto as regiões do hipocampo e do córtex, os dias embrionários 18 e 20 dos ratos podem representar o final do primeiro trimestre e o início do segundo trimestre da gestação humana (CLANCY et al., 2001). Enquanto que durante a segunda e terceira semana pós-natal dos roedores equivalem ao desenvolvimento do SNC de crianças de 3 a 6 anos de idade, respectivamente (MARCO et al., 2011). O esquema abaixo ilustra uma comparação do período de desenvolvimento do SNC entre humanos e roedores (Figura 1).



**Figura 1.** Comparação entre o desenvolvimento do SNC entre roedores e humanos. DE: dia embrionário; DPN: dia pós-natal (Adaptado de CLANCY et al., 2001; MARCO et al., 2011; TCHEKALAROVA et al., 2005; WILLIAMS et al., 2008).

No TDAH, estudos de neuroimagem já relataram que nos pacientes com o transtorno o processo de maturação do SNC ocorre de forma mais lenta e atrasada em diversas regiões encefálicas se comparado com o de pessoas sem o transtorno (EL-SAYED et al., 2007; RUBIA, 2007; SHAW et al., 2007). Além disso, alterações na conectividade na Rede em Modo Padrão (DMN, do inglês *Default Mode Network*), nas redes associadas às funções executivas e no sistema límbico também foram observadas no TDAH (CAO et al., 2009; CASTELLANOS et al., 2009; WANG et al., 2009; FAIR et al., 2010).

### 1.1.5.1 *Sonic Hedhehog*

A SHH (do inglês *Sonic Hedhehog*) é participante da família de proteínas *Hedgehog* e está diretamente envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso central, especialmente modelando o tubo neural. A SHH também induz a neurogênese no mesencéfalo dopaminérgico, na corda espinhal e no prosencéfalo basal, assim como regula os neurônios serotoninérgicos e dopaminérgicos da placa neural inferior. Além disso, a SHH apresenta efeitos neuroprotetores e neurotróficos em diversos tipos de neurônios no sistema nervoso central (CHIANG et al., 1996; CHARYTONIUK et al., 2002; PATEL et al., 2017). A sua expressão já foi quantificada em várias espécies, incluindo ratos, camundongos, peixes, sapos, aves e humanos (CHIANG et al., 1996). No cérebro de ratos, a SHH e os seus receptores, *Smoothed* (Smo) e *Patched* (Ptch), já foram identificados em diversas regiões como no córtex, nos gânglios da base, no hipotálamo, no cerebelo, no hipocampo, no bulbo olfatório, no tálamo e nas meninges (TRAIFFORT et al., 1999; CHARYTONIUK et al., 2002; TRAIFFORT et al., 2010). Além da importância durante o desenvolvimento embrionário, a SHH continua sendo secretada após o nascimento. Vários estudos já demonstraram o envolvimento da sinalização da SHH em neuropatologias como, doença de Parkinson (TSUBOI; SHULTS, 2002; COOPER et al., 2010), desordens do espectro autista (AL-AYADHI, 2012), epilepsia (LONG, F. et al., 2001; BANERJEE et al., 2005; FENG et al., 2016), síndrome de Down (DAS et al., 2013; DUTKA et al., 2015) e alterações de locomoção (DASS et al., 2002). Enquanto que a hiperativação da sinalização da SHH relaciona-se com o desenvolvimento de tumores cerebrais, tais como, gliomas, meduloblastoma, adenomas pituários, glioblastoma multiforme, astrocitoma, hemartoma hipotalâmico e tumores primitivos do neuroectoderma (revisado em PATEL et al., 2017).

### 1.1.5.2 GAP-43

A Proteína Associada ao Crescimento 43 (GAP-43, do inglês *Growth Associated Protein 43*) está presente de forma abundante nos cones axonais em crescimento, desempenhando papel fundamental na plasticidade neural durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (GRASSELLI et al., 2013). Camundongos que não expressam a proteína GAP-43 apresentam prejuízos em diversas vias de sinalização no SNC e menores taxas de sobrevivência após o nascimento (STRITTMATTER et al., 1995; MAIER et al., 1999). A GAP-43 não é importante somente durante o desenvolvimento, visto que ela também participa da remodelação axonal no encéfalo adulto (GRASSELLI et al., 2013). Alterações na sua expressão já foram observadas em algumas neuropatologias humanas, tais como, esclerose múltipla, doença

de Alzheimer e esquizofrenia, assim como nos seus respectivos modelos animais, os quais podem sugerir a ocorrência de danos axonais (GRASSELLI et al., 2013). Em pacientes com a doença de Alzheimer, a expressão de GAP-43 está diminuída no córtex frontal e em algumas áreas do hipocampo, havendo uma correlação positiva entre a presença da proteína com as placas senis (BOGDANOVIC et al., 2000). Na esclerose múltipla, a GAP-43 também apresenta-se em menor quantidade em 74% das lesões na matéria branca, independentemente do grau da lesão (TEUNISSEN et al., 2006). Na esquizofrenia por sua vez, análises de tecidos post-mortem já identificaram uma maior quantidade de GAP-43 nas regiões do córtex frontal e visual de pacientes esquizofrênicos (PERRONE-BIZZOZERO et al., 1996). Diversos estudos já reportaram o envolvimento da GAP-43 na liberação dos neurotransmissores e na plasticidade sináptica, interagindo com os componentes da maquinaria sináptica, como a Proteína Associada ao Sinaptossoma 25 (SNAP-25, do inglês *Synaptosomal-associated protein 25*), a syntaxina, a Proteína de Membrana Associada a Vesícula (VAMP, do inglês *Vesicle associated membrane proteins*) e a rabaptina-5, a qual regula a reciclagem das vesículas sinápticas (revisado em GRASSELLI et al., 2013).

## **1.2 JUSTIFICATIVA**

Durante as fases iniciais da vida, o sistema nervoso central naturalmente passa por um intenso processo de maturação e remodelação sináptica. Algumas alterações comportamentais e neuroquímicas já são conhecidas para o TDAH e ocorrem no decorrer da infância do paciente, mas não explicam na sua totalidade as diferenças na sintomatologia e na resposta ao tratamento. De fato, cerca de 30% das crianças não respondem bem ao tratamento e ainda neste contexto há uma clara diferença de gênero na sintomatologia. Com isso, surge a necessidade de analisar minuciosamente e identificar tais alterações ao longo da infância nos ratos SHR machos e fêmeas, com o intuito de contribuir para o entendimento da neurobiologia do TDAH bem como investigar novas drogas com melhor potencial terapêutico.

## **1.3 OBJETIVO**

### **1.3.1 Objetivo geral**

O presente estudo visou investigar aspectos comportamentais e o padrão de expressão de proteínas envolvidas no desenvolvimento do SNC durante a infância, com ênfase nas diferenças entre os sexos de um modelo animal do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), mimetizados pelos ratos SHR e comparados ao seu controle Wistar Kyoto (WKY) a fim de aprofundar os conhecimentos sobre as bases neurobiológicas desse transtorno.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar diferenças comportamentais durante o início e o final da infância dos animais da linhagem SHR (modelo de TDAH) comparados à linhagem controle WKY em ambos os sexos.
- Verificar diferenças no imunoconteúdo de proteínas relacionadas ao desenvolvimento em períodos iniciais e finais da infância de ambos sexos da linhagem SHR comparadas à linhagem controle WKY.



## **2. ARTIGO CIENTÍFICO**

**Periódico:** Behavioural Brain Research

**Título:** Avaliação de parâmetros neuroquímicos e comportamentais em ambos os sexos de ratos pré-púberes de um modelo do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

**Normas da revista:** disponível em:

[https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/506045?generatepdf=true](https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506045?generatepdf=true) e

Anexo I.

AValiação DE PARâMETROS NEUROQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM  
AMBOS OS SEXOS DE RATOS PRÉ-PÚBERES DE UM MODELO DO TRANSTORNO  
DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

Amanda Staldoni Almeida, Fernanda de Medeiros Flores Nunes, Daniela Melo Marques, Lisiane de Oliveira Porciúncula\*

Laboratórios de Estudos sobre o Sistema Purinérgico, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, 90035-003. Porto Alegre, RS, Brasil

\* Autor correspondente: Laboratórios de Estudos sobre o Sistema Purinérgico, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Fax: +55 51 3308 5540.

Endereço de e-mail: [loporciuncula@gmail.com](mailto:loporciuncula@gmail.com) (LO Porciúncula).

## RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns da infância, cuja sintomatologia sofre forte influência do gênero. Os estudos de neuroimagem revelam que no TDAH ocorre um atraso na maturação do sistema nervoso central (SNC) dos pacientes. Neste trabalho, foram utilizados os ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*), pois são considerados o modelo mais validado para os estudos sobre o TDAH. No decorrer da infância desses animais, foram realizados testes comportamentais e analisados os níveis de duas proteínas envolvidas com o desenvolvimento do sistema nervoso central: a SHH (do inglês *Sonic Hedgehog*) e a Proteína Associada ao Crescimento 43 (GAP-43, do inglês *Growth Associated Protein 43*). No 8º dia pós-natal realizou-se o teste de preferência pelo odor materno e no 22º dia pós-natal, o teste de preferência pelo objeto novo foi aplicado nos animais Wistar Kyoto (WKY) e SHR de ambos os sexos. O imunoconteúdo das proteínas SHH e GAP-43 foram analisados no 8º e no 22º dia pós-natal no hipocampo, córtex pré-frontal e bulbo olfatório de ambos os sexos dos animais WKY e SHR. Somente as fêmeas SHR apresentaram um prejuízo cognitivo em ambos os testes comportamentais durante a infância. Além disso, observou-se um aumento no imunoconteúdo da SHH no 22º dia pós-natal (DPN) em comparação com o 8º DPN em ambas as linhagens e sexos no hipocampo, enquanto que a GAP-43 aumentou dessa forma no bulbo olfatório e no córtex pré-frontal em ambos os sexos e linhagens. Contudo, no bulbo olfatório e no córtex pré-frontal ambos os sexos dos animais SHR não aumentaram os níveis da GAP-43 na mesma proporção que os animais controles WKY. Os dados comportamentais mostram que já é possível identificar prejuízos cognitivos e diferenças entre os sexos em idades bastante precoces dos animais modelo do TDAH. Enquanto que a análise neuroquímica revela que as alterações na imunexpressão de proteínas importantes no desenvolvimento do sistema nervoso central também podem estar envolvidas na neurobiologia do TDAH.

Palavras-chave: TDAH. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Infância. Diferenças de sexo. GAP-43. SHH.

## 1. Introdução

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é uma desordem psiquiátrica do desenvolvimento caracterizada pelos sintomas da desatenção, hiperatividade e impulsividade, prevalecendo em cerca de 3,4% das crianças e adolescentes no mundo [1]. Outra característica importante reside na influência que a sintomatologia do TDAH sofre de acordo com o gênero do paciente, visto que os meninos com o transtorno manifestam de forma mais evidente a hiperatividade e impulsividade, enquanto que nas meninas com TDAH prevalece o sintoma da desatenção [2].

Embora diversos estudos estejam aprofundando o conhecimento sobre as bases neurológicas desse transtorno, ainda não há nenhum biomarcador do TDAH, restringindo o seu diagnóstico a identificação dos sintomas clínicos dos pacientes. Além disso, o TDAH é frequentemente mais diagnosticado nos meninos do que nas meninas, numa proporção de 2,28 : 1 [3]. Uma possível explicação para esse diagnóstico diferencial reside na maior facilidade de identificação dos sintomas da hiperatividade e impulsividade que são mais evidentes nos meninos, enquanto que o predomínio da desatenção nas meninas dificulta o diagnóstico do TDAH nas pacientes do sexo feminino [2].

O modelo animal mais utilizado nos estudos sobre o TDAH são os ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*), visto que são os únicos animais que apresentam validade de face, construto e preditiva, três critérios que o determinam como um bom modelo animal [4]. Na vida adulta, os animais SHR desenvolvem hipertensão, sendo úteis em estudos cardiovasculares [5]. No entanto, durante a infância e adolescência, esses animais apresentam impulsividade, hiperatividade e desatenção, as características fundamentais do TDAH [4].

Estudos de neuroimagem já relataram que nos pacientes com TDAH o processo de maturação do sistema nervoso central (SNC) ocorre de forma de mais lenta e atrasada em diversas regiões encefálicas se comparado com o de pessoas sem o transtorno [6–8]. A proteína SHH (do inglês *Sonic Hedgehog*) e proteína a Proteína Associada ao Crescimento 43 (GAP-43, do inglês *Growth Associated Protein 43*) estão diretamente envolvidas no desenvolvimento, plasticidade e maturação do SNC [9–11]. Além disso, alterações nas expressões e vias de sinalização da SHH e da GAP-43 já foram identificadas em neuropatologias, tais como, desordens do espectro autista [12] e esquizofrenia [13], respectivamente.

Com base nas diferenças de gênero e nas alterações no desenvolvimento do SNC no TDAH, torna-se importante analisar parâmetros comportamentais e neuroquímicos na infância de animais modelo do TDAH. Assim, o objetivo deste estudo é investigar os aspectos comportamentais e as variações do imunoconteúdo das proteínas SHH e GAP-43 durante a infância, com ênfase nas diferenças entre os sexos de um modelo experimental do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), mimetizados pelos ratos SHR comparados ao seu controle (WKY) a fim de aprofundar os conhecimentos sobre as bases neurobiológicas desse transtorno.

## **2. Materiais e Métodos**

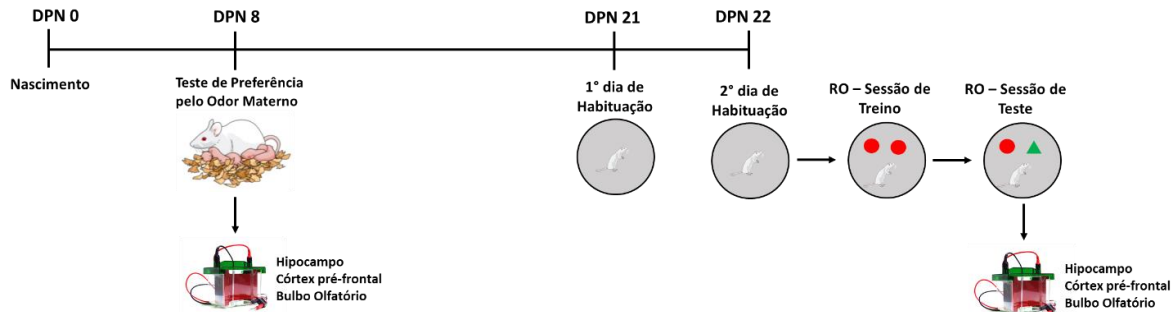
### *2.1 Animais*

Ratos da linhagem SHR criados a partir de progenitores Wistar Kyoto (WKY) foram utilizados e assim a linhagem de ratos WKY foi selecionada como controle para os SHR. Os animais foram provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais foram alimentados com ração comercial e água à vontade e mantidos em gaiolas residência nas salas de experimentação do próprio Biotério, as quais apresentam temperatura de  $22 \pm 2$  °C, umidade entre 60-80 % e ciclo claro/escuro de 12 horas. Após a realização dos testes comportamentais no 8° e no 22° dia pós-natal (DPN), os animais foram eutanasiados por decapitação, sendo dissecadas as regiões encefálicas do hipocampo, córtex pré-frontal e bulbo olfatório para posterior análise por imunoblotting. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com o Guia para Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório (Guia do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos - *NIH*) e com a Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA-UFRGS – Número de protocolo 29196).

### *2.2 Desenho experimental*

O dia pós-natal (DPN) zero representa o dia de nascimento dos animais, a partir de então foi dado início ao protocolo do estudo. Após 8 dias (DPN 8), os animais de ambas as linhagens e sexos foram submetidos ao teste de preferência de odor materno e, em seguida, metade da ninhada de animais foi eutanasiada e amostras de hipocampo, córtex pré-frontal e bulbo olfatório foram armazenadas para posterior análise por *Western Blot*. No DPN 21, os animais realizaram o 1° dia de habituação ao aparato do campo aberto. No dia seguinte (DPN 22), os animais foram submetidos ao 2° dia de habituação e imediatamente após foi realizado o teste de reconhecimento de objeto novo. Finalmente, novamente amostras de hipocampo,

córtex pré-frontal e bulbo olfatório dos animais foram armazenados para posterior análise neuroquímica por *Western Blot*. O esquema abaixo ilustra o desenho experimental realizado nesse trabalho (Figura 2).



**Figura 2.** Desenho Experimental ilustrado do estudo. (DPN: dia pós-natal; RO: Teste de Reconhecimento de Objeto Novo).

### 2.3 Teste de Preferência pelo Odor Materno

No 8º dia pós-natal, os grupos de animais WKY e SHR de ambos os sexos realizaram a tarefa comportamental de preferência pelo odor materno. Essa tarefa avalia o vínculo existente entre os filhotes e a mãe, visto que estudos anteriores já demonstraram que uma relação estável entre a mãe e a prole é fundamental para que haja um crescimento e desenvolvimento comportamental adequado dos roedores. A tarefa de preferência pelo odor materno foi realizada em uma caixa de plástico (34 cm x 24 cm x 40 cm), dividida em 2 áreas sendo separadas por uma zona neutra de 2 cm. No início de cada teste, foram colocadas no canto de cada área 300 ml de maravalha limpa, considerada como odor neutro, e 300 ml de maravalha da caixa de moradia, considerada como odor materno. O filhote foi posicionado na região correspondente à área neutra. Para cada animal foram realizadas 5 sessões com duração de 1 minuto cada e 1 minuto de intervalo entre elas. Ao fim de cada sessão, a caixa foi higienizada com álcool 70% e as maravalhas randomicamente posicionadas [14].

### 2.4 Teste de Reconhecimento de Objeto Novo

O teste de reconhecimento de objeto novo foi baseado no estudo de Morgan *et al.*, (2011). Utilizou-se o aparato do campo aberto, que consiste em uma caixa de madeira preta de formato redondo (50 cm x 41 cm). Os animais foram habituados ao aparato durante dois dias que consistiram em sessões de exposição ao aparato por cinco minutos seguidos de intervalos de dois minutos. A habituação foi de um total de oito sessões por dia sendo que foi permitido aos animais explorarem livremente o aparato. A habituação ao aparato foi realizada no 21º dia pós-natal e novamente no 22º dia pós-natal, sendo a sessão de treino realizada logo em segui-

da ao término do segundo dia de habituação. Nessa sessão, os animais são expostos durante 5 minutos aos dois objetos idênticos dispostos no aparato. Após o intervalo de dois minutos da sessão de treino foi realizada a sessão de teste. Nessa sessão, um dos objetos foi substituído por um objeto novo e os animais os exploraram por 5 minutos. Os objetos consistiam em garrafas (13 cm de altura) que diferiam em cor, formato e textura que foram posicionadas em cantos opostos do aparato e 9 cm de distância da parede. O aparato e os objetos foram higienizados com álcool 70% entre cada sessão. Para calcular o tempo de exploração nos objetos, foi cronometrado o tempo em que o animal direcionou o nariz para o objeto a uma distância de  $\leq 2$  cm e/ou tocou o objeto com o nariz ou com as patas dianteiras. O software *Anymaze* filmou e quantificou a locomoção dos animais.

### 2.5 Western Blot

O imunoconteúdo das proteínas SHH e GAP-43 foi avaliado no hipocampo, córtex pré-frontal e bulbo olfatório de animais WKY e SHR de 8° e 22° dia pós-natal. As estruturas foram homogeneizadas utilizando SDS 5% (dodecil sulfato de sódio) com 0,1% de inibidores de fosfatase e de protease (Sigma, São Paulo/Brasil) e armazenadas à -20°C. A quantificação de proteína total foi determinada pelo ensaio de ácido bicinconínico (BCA, Pierce), utilizando albumina sérica bovina (ASB) como padrão (Sigma-Aldrich, São Paulo/Brasil). As amostras foram normalizadas para a quantidade final de proteína entre 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Cerca de 40  $\mu\text{g}$  de proteína foram aplicadas e separadas em gel poliacrilamida por SDS-PAGE (12-14% o gel de corrida). Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose (Amersham, São Paulo/Brasil). O bloqueio foi realizado durante 1h à temperatura ambiente. As membranas para marcação da Shh foram bloqueadas e incubadas com 5% leite desnatado em solução salina tamponada contendo Tris e 0,1% Tween-20 (TBS-T). Para a marcação da GAP-43, as membranas foram bloqueadas e incubadas com 3% ASB em solução salina tamponada com Tris e Tween-20 0,1% (TBS-T). A incubação foi *overnight* (durante a noite) à 4°C com os seguintes anticorpos primários: monoclonal de camundongo anti-SHH (1:2000, Abcam) e policlonal de coelho anti-GAP-43 (1:4000, Abcam). As membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com seus respectivos anticorpos secundários conjugados a *horseradish peroxidase* (HRP) por 1h à temperatura ambiente e a revelação foi feita com a adição do substrato quimioluminescente ECL (Amersham, São Paulo/Brasil). A análise densitométrica foi realizada utilizando o software ImageJ. A  $\beta$ -tubulina é uma proteína constitutiva e foi utilizada como controle endógeno para a expressão de proteínas, sendo

quantificada pela incubação do anticorpo monoclonal de camundongo anti- $\beta$ -tubulina (1:10000, Santa Cruz Biotechnologies, São Paulo/Brasil).

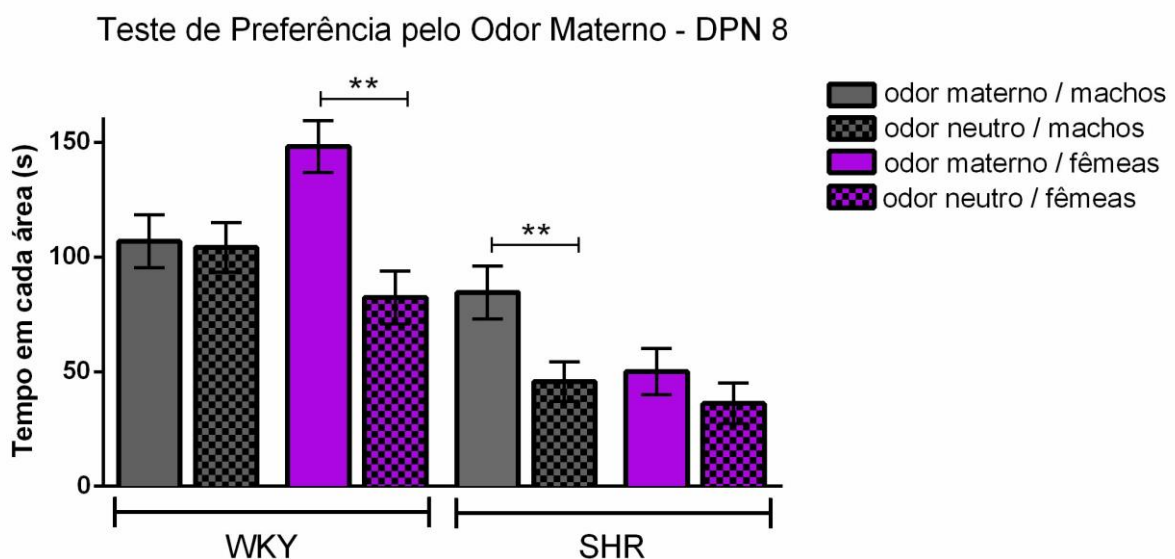
## 2.6 Análises estatísticas

Os dados comportamentais foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por teste t de *Student* pareado ou não pareado, ou ANOVA de duas vias seguida de teste *pos hoc* de Tukey. Os dados do *Western Blot* foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por ANOVA de duas vias seguida de teste *pos hoc* de Tukey para múltiplas comparações, cujos fatores foram dias pós-natais e linhagem. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ .

## 3. Resultados

### 3.1 Teste de Preferência pelo Odor Materno

A figura 3 mostra o desempenho dos animais Wistar Kyoto (WKY) e SHR de ambos os sexos no teste de preferência pelo odor materno no 8º dia pós-natal. Os machos WKY não apresentaram diferenças no tempo gasto em cada área correspondente à maravalha oriunda do odor materno ou odor neutro. As fêmeas WKY gastaram mais tempo na área com a maravalha proveniente da caixa de moradia (odor materno) do que a maravalha nova (odor neutro) ( $t = 3,224$ ;  $P = 0,0045$ ). Quanto as fêmeas SHR, não houve diferença significativa entre os tempos de cada área. Os machos SHR por sua vez, gastaram mais tempo na área correspondente a maravalha vinda da caixa de moradia ( $t = 2,796$ ;  $P = 0,0093$ ).



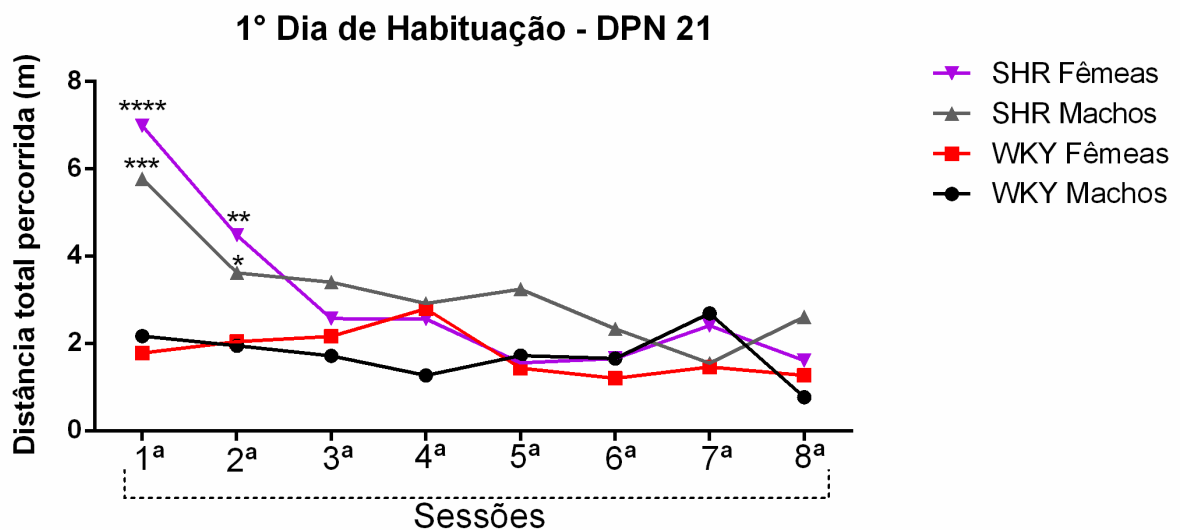
**Figura 3.** Desempenho de ambos os sexos dos animais WKY e SHR no teste de preferência pelo odor materno. Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média do tempo gasto na área do odor neutro ou na área do odor materno por ambos os sexos das linhagens WKY e SHR ( $n = 17 - 29$ , por grupo). Dados analisados por



teste t de *Student* pareado.  $**P \leq 0,01$ , quando significativamente diferente entre o tempo gasto na área do odor neutro e na do odor materno no mesmo grupo. (DPN: dia pós-natal).

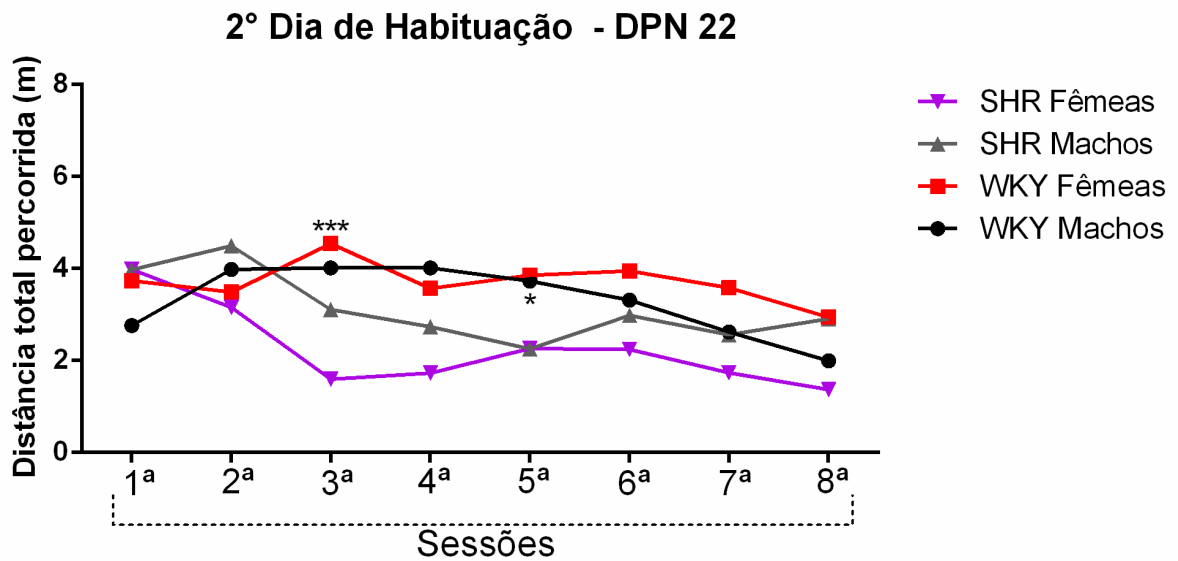
### 3.2 Tarefa de reconhecimento de objeto novo

A figura 4 representa a locomoção dos animais WKY e SHR de ambos os sexos em cada sessão da habituação ao aparato do teste de reconhecimento de objeto novo no primeiro dia de experimento. As fêmeas SHR apresentaram hiperlocomoção na 1ª ( $t = 6,034$ ;  $P = 0,0001$ ) e na 2ª ( $t = 3,147$ ;  $P = 0,0041$ ) sessão da habituação comparadas às fêmeas WKY nas mesmas sessões. Os animais machos SHR também apresentaram uma hiperlocomoção na 1ª ( $t = 4,287$ ;  $P = 0,0003$ ) e na 2ª ( $t = 2,582$ ;  $P = 0,0167$ ) sessão da habituação comparados aos machos WKY nas mesmas sessões.



**Figura 4.** Desempenho de ambos os sexos dos animais WKY e SHR na habituação ao aparato do teste de reconhecimento de objeto novo no primeiro dia de experimento. Os dados são representados pela média da distância total percorrida por ambos sexos e linhagens WKY e SHR ( $n = 10 - 19$ , por grupo). Dados analisados por teste t de *Student* não pareado.  $*P \leq 0,05$ ,  $**P \leq 0,01$ ,  $***P \leq 0,001$ ,  $****P \leq 0,0001$ , quando significativamente diferente entre a distância total percorrida em cada sessão de habituação entre machos e fêmeas de cada linhagem. (DPN: dia pós-natal).

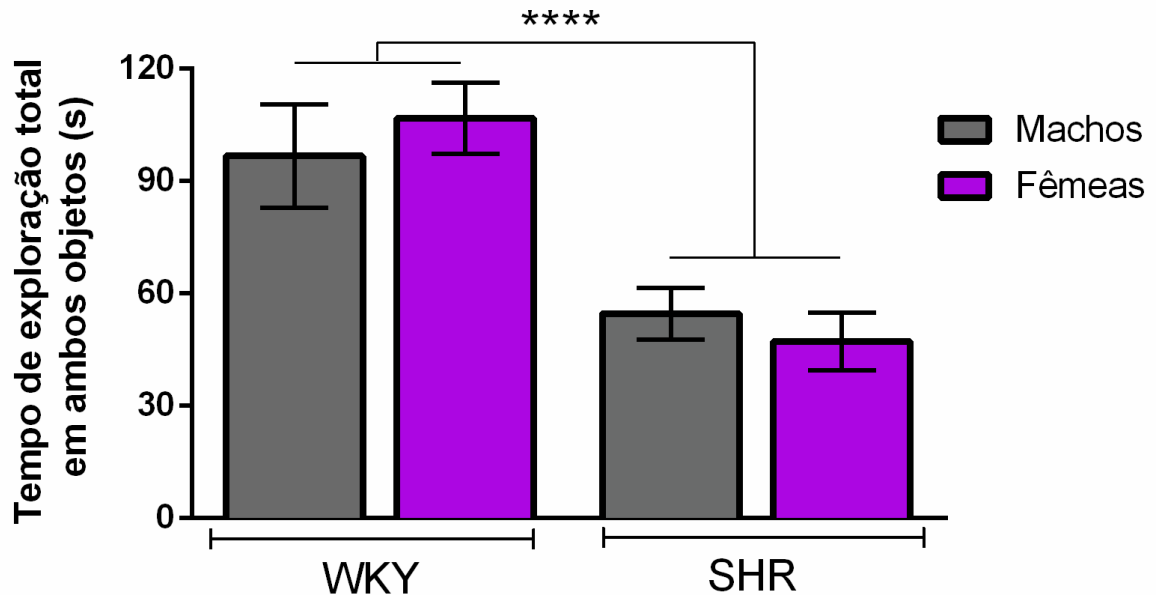
A figura 5 mostra a locomoção dos animais WKY e SHR de ambos os sexos na habituação ao aparato do teste de reconhecimento de objeto novo, no segundo dia de habituação. Na 3ª sessão houve uma diferença significativa entre as fêmeas WKY e as fêmeas SHR ( $P = 0,0008$ ;  $t = 3,798$ ). Na 5ª sessão houve uma diferença significativa na locomoção entre os machos WKY e os machos SHR ( $t = 2,059$ ;  $P = 0,0493$ ).



**Figura 5.** Desempenho de ambos os sexos dos animais WKY e SHR na habituação ao aparato do teste de reconhecimento de objeto novo no segundo dia de experimento. Os dados são representados pela média da distância total percorrida por ambos sexos e linhagens WKY e SHR ( $n = 10 - 19$ , por grupo). Dados analisados por teste t de *Student* não pareado.  $*P \leq 0,05$ ,  $***P \leq 0,001$ , quando significativamente diferente entre a distância total percorrida em cada sessão de habituação entre machos e fêmeas de cada linhagem. (DPN: dia pós-natal).

A figura 6 representa o tempo de exploração de ambos os objetos na sessão de treino no teste de reconhecimento de objeto novo de ambos os sexos e linhagens. Os animais machos e fêmeas SHR exploraram menos tempo os ambos os objetos na sessão de treino comparados com ambos os sexos dos animais WKY ( $F_{(1, 45)} = 31,02$ ;  $P = 0,0001$ ).

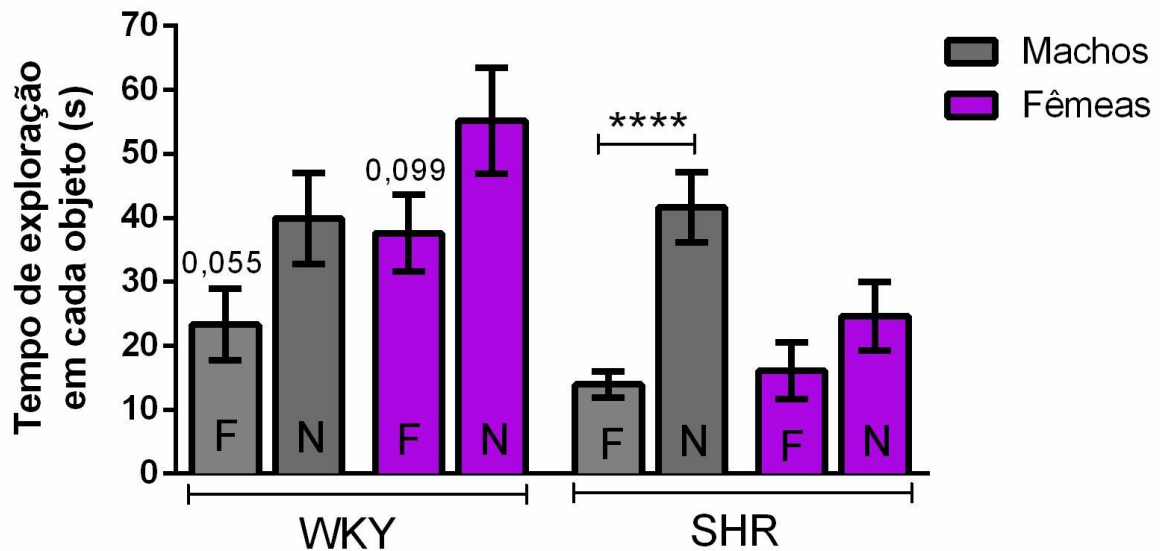
## Teste de Reconhecimento de Objeto Novo Sessão de Treino - DPN 22



**Figura 6.** Exploração total em ambos os objetos na sessão de treino. Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média do tempo total de exploração de ambos os objetos na sessão de treino por ambas as linhagens e sexos ( $n = 7 - 17$  por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguida de teste *pos hoc* de Tukey. \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ , quando significativamente diferente entre o tempo de exploração dos objetos entre as linhagens. (DPN: dia pós-natal).

A figura 7 representa o tempo de exploração em cada objeto na sessão de teste por ambos os sexos e linhagens no teste de reconhecimento de objeto novo. Os animais machos e fêmeas WKY mostraram uma tendência a explorar mais o objeto novo do que o familiar na sessão de teste ( $P = 0,055$  e  $P = 0,099$ , respectivamente). Os machos SHR exploraram mais o objeto novo do que o familiar ( $t = 5,353$ ;  $P = 0,0001$ ) enquanto as fêmeas SHR exploraram igualmente ambos os objetos na sessão de teste.

## Teste de Reconhecimento de Objeto Novo Sessão de Teste - DPN 22

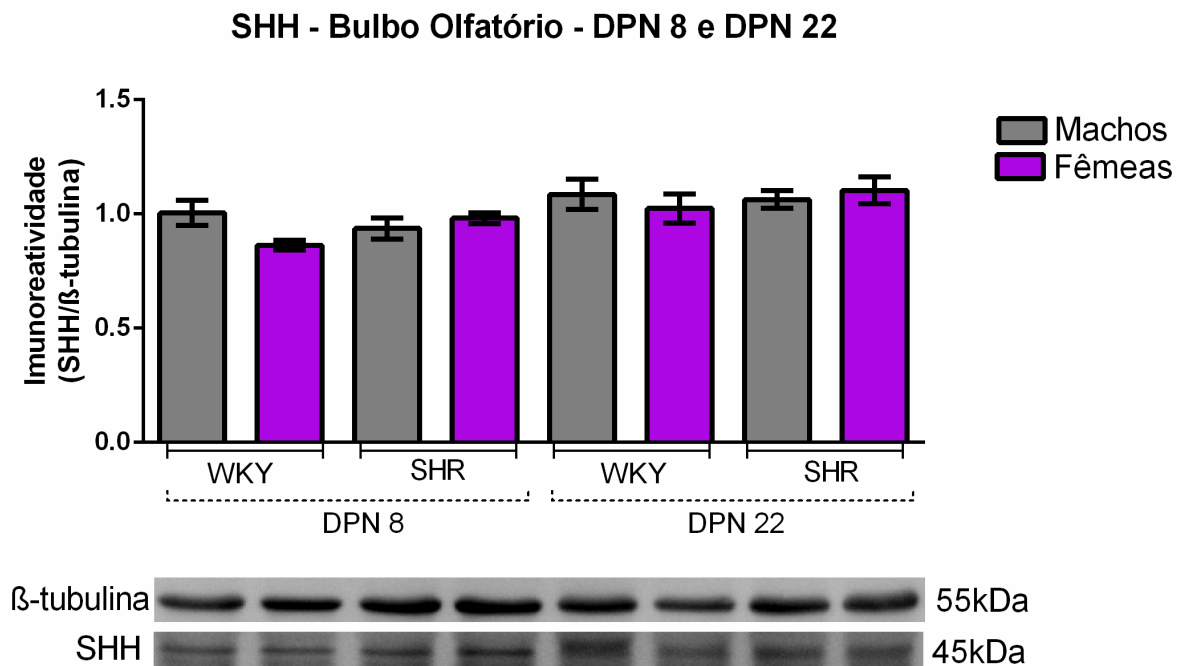


**Figura 7.** Exploração dos objetos na sessão de teste pelos animais WKY e SHR de ambos os sexos no teste de reconhecimento de objeto novo. Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média do tempo de exploração em cada objeto na sessão de teste por ambas as linhagens e sexos ( $n = 7 - 17$  por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguida de *pos hoc* de Tukey para múltiplas comparações. \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ , quando o tempo de exploração entre o objeto novo e o familiar for significativamente diferente entre o mesmo grupo. (F: Objeto familiar; N: Objeto novo; DPN: dia pós-natal).

### 3.3 Western Blot

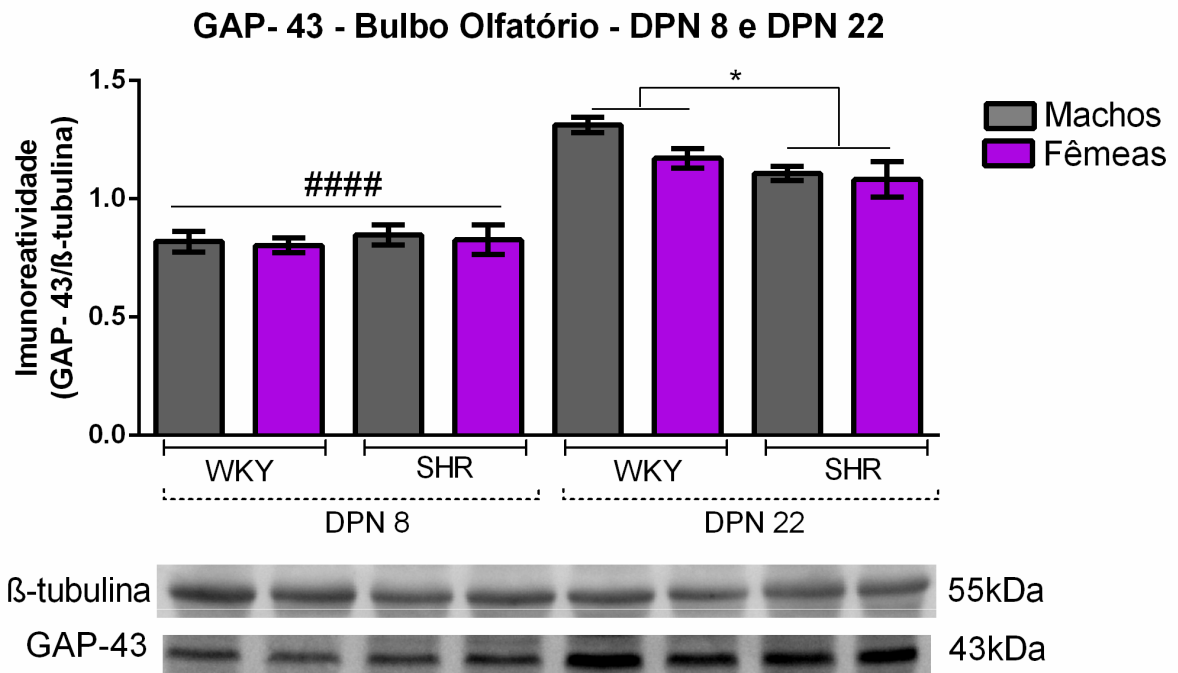
#### 3.3.1 Bulbo Olfatório

A figura 8 mostra o imunocnteúdo da proteína SHH no bulbo olfatório dos animais machos e fêmeas de ambas as linhagens no 8° e no 22° dia pós-natal. As amostras de bulbo olfatório dos animais de ambas linhagens e sexo não apresentaram nenhuma diferença no imunocnteúdo da proteína SHH entre os dias pós-natais.



**Figura 8.** Imunoconteúdo da SHH no bulbo olfatório dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal. Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média do imunoconteúdo em cada dia e grupo analisado ( $n = 7$  por grupo). O ANOVA de duas vias seguida do *pos hoc* de Tukey não revelou efeito no imunoconteúdo da SHH entre os dias pós-natais, os sexos e as linhagens. (DPN: dia pós-natal).

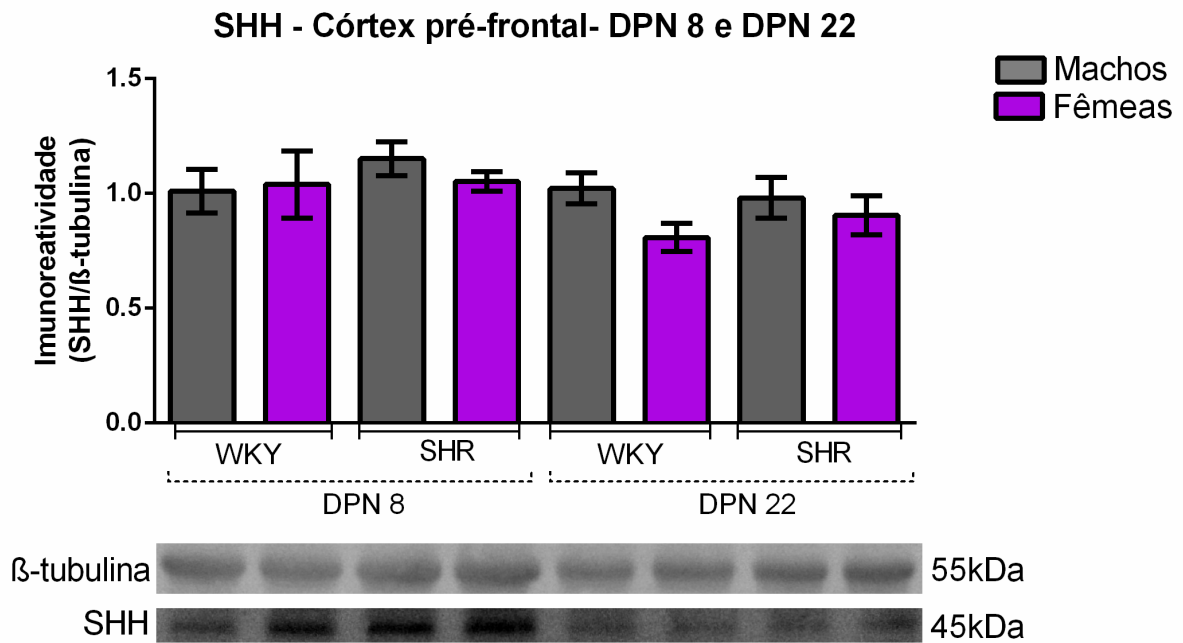
A figura 9 mostra o imunoconteúdo da proteína GAP-43 no bulbo olfatório dos animais machos e fêmeas de ambas as linhagens no 8° e no 22° dia pós-natal. A ANOVA de duas vias seguida do *pos hoc* de Tukey revelou um efeito entre os dias pós-natais, indicando um aumento do imunoconteúdo da GAP-43 no 22° dia pós-natal comparado ao 8° dia pós-natal em ambas as linhagens e sexos ( $F_{(1, 42)} = 108,2$ ;  $P = 0,0001$ ). Houve também um efeito entre as linhagens WKY e SHR no 22° dia pós-natal, onde os SHR não aumentaram o imunoconteúdo da GAP-43 tanto quanto os WKY ( $F_{(1, 23)} = 4,527$ ;  $P = 0,0443$ ).



**Figura 9.** Imunoconteúdo da GAP-43 no bulbo olfatório dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal. Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média do imunoconteúdo em cada dia e grupo analisado ( $n = 7$  por grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do *pos hoc* de Tukey para múltiplas comparações. #### $P \leq 0,0001$ , \* $P \leq 0,05$ . (DPN: dia pós-natal).

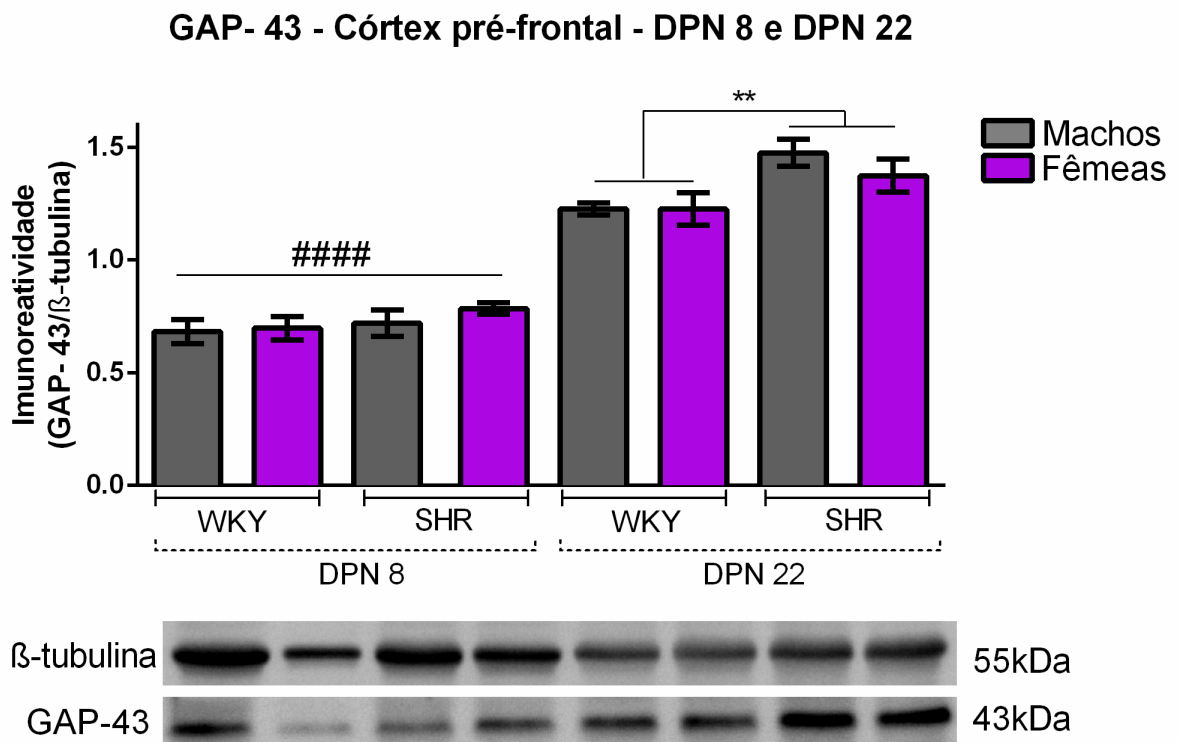
### 3.3.2 Córtex pré-frontal

A figura 10 mostra o imunoconteúdo da proteína SHH no córtex pré-frontal dos animais machos e fêmeas de ambas as linhagens no 8° e no 22° dia pós-natal. Não foram encontradas nenhuma diferença estatística entre os dias pós-natais, nem entre os sexos e as linhagens.



**Figura 10.** Imunoconteúdo da SHH no córtex pré-frontal dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal. Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média do imunoconteúdo em cada dia e grupo analisado ( $n = 7$  por grupo). O ANOVA de duas vias seguida do *pos hoc* de Tukey não revelou efeito no imunoconteúdo da SHH entre os dias pós-natais, os sexos e as linhagens. (DPN: dia pós-natal).

A figura 11 mostra o imunoconteúdo da proteína GAP-43 no córtex pré-frontal dos animais machos e fêmeas de ambas as linhagens no 8° e no 22° dia pós-natal. A ANOVA de duas vias seguida do *pos hoc* de Tukey revelou um efeito entre os dias pós-natais, indicando um aumento do imunoconteúdo da GAP-43 no 22° dia pós-natal comparado ao 8° dia pós-natal em ambas as linhagens e sexos ( $F_{(1, 48)} = 235,1$ ;  $P = 0,0001$ ). Houve também um efeito entre as linhagens WKY e SHR no 22° dia pós-natal, onde os SHR aumentaram o imunoconteúdo da GAP-43 em uma maior proporção comparados aos WKY ( $F_{(1, 22)} = 12,31$ ;  $P = 0,0020$ ).

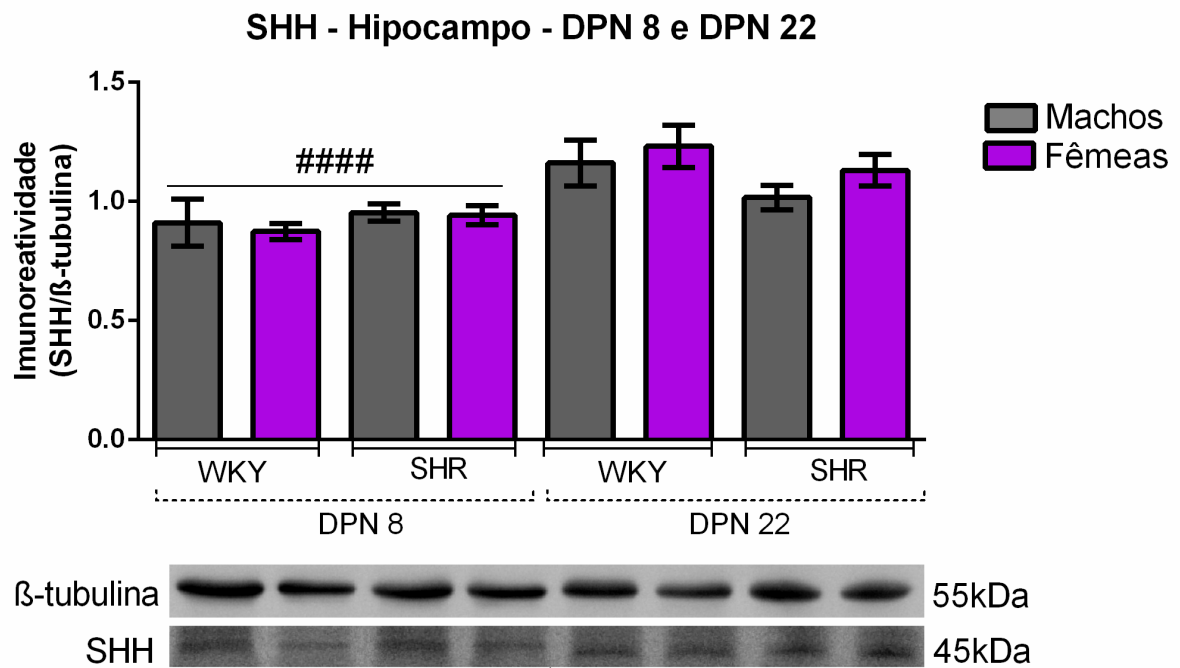


**Figura 11.** Imunoconteúdo da GAP-43 no córtex pré-frontal dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal. Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média do imunoconteúdo em cada dia e grupo analisado (n = 7 por grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do *pos hoc* de Tukey para múltiplas comparações. #### $P \leq 0,0001$ , \*\* $P \leq 0,01$ . (DPN: dia pós-natal).

### 3.3.3 Hipocampo

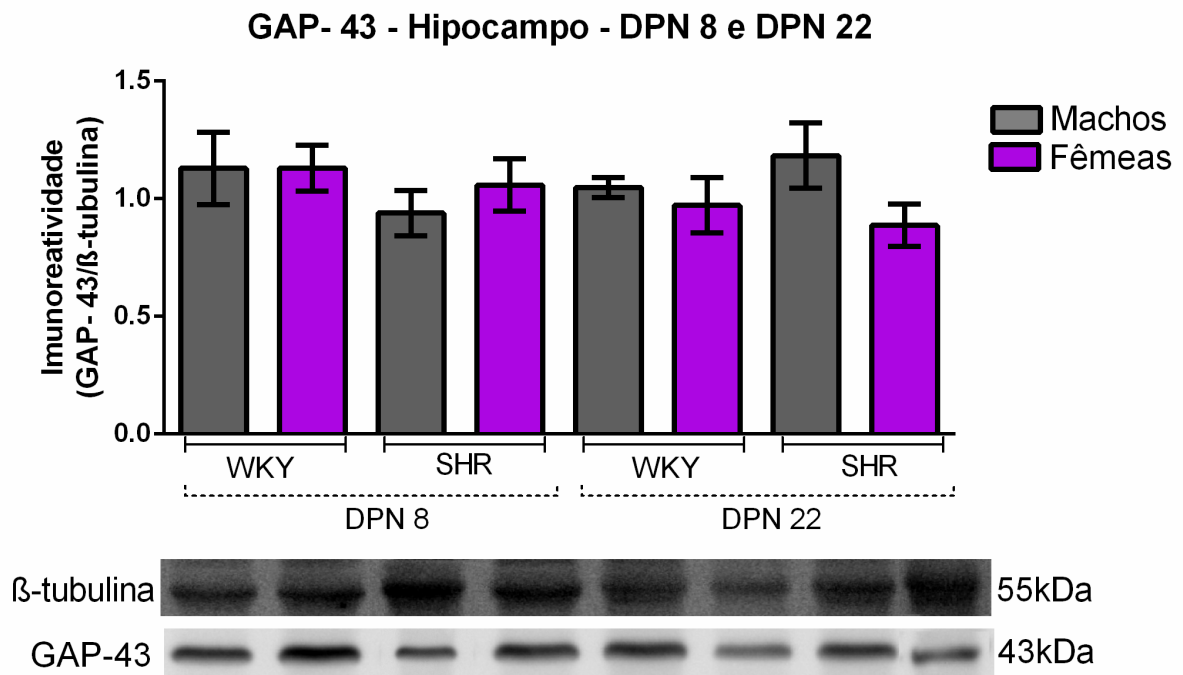
A figura 12 mostra o imunoconteúdo da proteína SHH no hipocampo dos animais machos e fêmeas de ambas as linhagens no 8° e no 22° dia pós-natal. A ANOVA de duas vias seguida do *pos hoc* de Tukey revelou um efeito entre os dias pós-natais, indicando um aumento do imunoconteúdo da SHH no 22° dia pós-natal comparado ao 8° dia pós-natal em ambas as linhagens e sexos ( $F_{(1,48)} = 19,50$ ;  $P = 0,0001$ ).





**Figura 12.** Imunoconteúdo da SHH no hipocampo dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal. Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média do imunoconteúdo em cada dia e grupo analisado (n = 7 por grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do *pos hoc* de Tukey para múltiplas comparações. #### $P \leq 0,0001$ . (DPN: dia pós-natal).

A figura 13 mostra o imunoconteúdo da proteína GAP-43 no hipocampo dos animais machos e fêmeas de ambas as linhagens no 8° e no 22° dia pós-natal. Não foram encontrados nenhuma diferença estatística entre os dias pós-natais, nem entre os sexos e as linhagens.



**Figura 13.** Imunoconteúdo da GAP-43 no hipocampo dos animais WKY e SHR de ambos os sexos no 8° e no 22° dia pós-natal. Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média do imunoconteúdo em cada dia e grupo analisado ( $n = 7$  por grupo). O ANOVA de duas vias seguida do *pos hoc* de Tukey não revelou efeito no imunoconteúdo da SHH entre os dias pós-natais, os sexos e as linhagens. (DPN: dia pós-natal).

#### 4. Discussão

O presente trabalho investigou possíveis diferenças comportamentais durante a infância dos ratos machos e fêmeas utilizados e validados como modelo experimental para o estudo do TDAH. Paralelamente, foram realizadas análises dos níveis proteicos da *Sonic hedgehog* (SHH) e GAP-43 em estruturas cerebrais envolvidas nos parâmetros comportamentais analisados.

O teste de preferência pelo odor materno é baseado na aprendizagem pelo olfato [16], pois o olfato é determinante para a sobrevivência dos animais nos primeiros dias pós-natais, visto que é por meio da identificação do odor da mãe que os filhotes são capazes de se localizarem, buscarem abrigo e se alimentarem [17]. Caso o vínculo mãe-prole esteja estabelecido adequadamente, a tendência natural do filhote é preferir a área contendo o odor familiar da mãe. Neste estudo, os animais machos WKY não demonstraram preferência por nenhum dos dois odores apresentados, ao passo que as fêmeas WKY preferiram a maravalha com o odor materno. O vínculo estabelecido entre a mãe e a prole é essencial para o desenvolvimento adequado tanto de roedores [18,19] quanto de humanos [20]. Embora já tenha sido observado que ambos os sexos de ratos Wistar (animais progenitores dos ratos Wistar Kyoto e amplamente utilizados em diversos estudos), manifestam uma preferência pela maravalha que con-

tém o odor materno [21], há uma carência de estudos com os animais WKY nesse teste comportamental. Portanto, esse resultado pode indicar um padrão comportamental característico da linhagem WKY. Quanto aos animais SHR, os machos preferiram o odor materno, enquanto que as fêmeas não demonstraram nenhuma preferência. No estudo de Prediger et al., (2005), já foi observado que os machos adultos SHR também não apresentaram nenhum prejuízo na discriminação olfatória comparados aos machos Wistar. Quanto às fêmeas SHR, se faz necessária a realização de outros estudos que embasem o prejuízo na aprendizagem olfatória observado nesse trabalho. Entretanto, é importante ressaltar que diferenças na maturação encefálica entre os gêneros dos pacientes com TDAH já estão descritas na literatura [23,24] e podem corroborar com o comportamento distinto apresentado entre machos e fêmeas SHR no 8º dia pós-natal. Então, a partir desse dado se verifica que as diferenças entre os sexos nos animais modelo do TDAH já podem ser observadas em idades mais precoces da vida, e influenciam a aprendizagem mediada pelo olfato nos animais modelo do transtorno.

As funções executivas compreendem um conjunto de processos cognitivos, responsáveis pelo controle dos nossos pensamentos, emoções e comportamento. No TDAH, já está bem estabelecido o prejuízo existente nessas funções [25], especialmente na memória de trabalho. Ademais, crianças diagnosticadas com o transtorno apresentam déficits na memória [26,27], assim como o modelo animal dos ratos SHR [28,29]. A tarefa de reconhecimento de objetos se baseia na característica inata dos roedores em explorar mais a novidade em um contexto que lhe é familiar, tornando possível avaliar a sua memória de reconhecimento [30]. Contudo, primeiramente é necessário realizar a habituação ao aparato, para que os roedores já estejam familiarizados ao ambiente do teste e os objetos se tornem o principal atrativo exploratório para os animais. A habituação ao aparato nos roedores é realizada através da exposição sucessiva do ambiente novo ao roedor, sendo que a redução da exploração e locomoção do animal indica a sua habituação ao contexto do aparato [31].

No presente estudo, os animais SHR de ambos os sexos apresentaram uma hiperlocomoção na 1ª e na 2ª sessão do primeiro dia de habituação comparados aos animais WKY. Nas demais sessões de habituação, ambas as linhagens e sexos percorreram distâncias equivalentes e se mantiveram estáveis. Já no segundo dia de habituação, os SHR não apresentaram essa hiperlocomoção nas duas sessões iniciais quando comparados aos animais controle, indicando que os animais modelo do TDAH foram capazes de habituar ao aparato. Além disso, a hiperlocomoção apresentada pelos SHR corrobora com os demais estudos da literatura em animais adultos [32].

No que diz respeito ao teste de reconhecimento de objeto novo, verificou-se que os animais SHR de ambos os sexos apresentaram um menor tempo total de exploração aos objetos durante a sessão de treino. O perfil desatento dos SHR pode ser uma possível explicação para esse resultado, pois conforme previamente relatado por Langen e Dost (2011), os animais adultos SHR apresentam um tempo de exploração menor aos objetos e, portanto, a desatenção característica desses animais pode afetar a sua motivação e/ou atividade exploratória desde a sua infância. Na sessão de teste, os animais controle WKY de ambos os sexos apresentaram uma tendência a explorar mais o objeto novo. Apesar de serem utilizados como animais controle da linhagem SHR, já foi descrito que os animais WKY apresentam déficits mnemônicos, visto que Grauer et al. (1993) já observou prejuízos na memória de trabalho nos WKY machos adultos. Entretanto, nossos dados ainda precisam ser confirmados tendo em vista que os animais apresentaram uma clara tendência a explorar mais o objeto novo. Quanto aos animais SHR, somente os machos apresentaram um desempenho satisfatório ao explorarem mais o novo objeto. Porém, as fêmeas SHR apresentaram um claro prejuízo na memória de reconhecimento. Esse prejuízo na memória de reconhecimento que variou de acordo com o sexo dos animais SHR corrobora com as diferenças de gênero existentes nesse transtorno [2,34–36]. Além disso, outros estudos já observaram déficits na memória de reconhecimento de fêmeas SHR adultas [37], sugerindo que nas fêmeas SHR o prejuízo mnemônico persiste até a idade adulta. Os estudos avaliando a memória de reconhecimento em ratos SHR adultos machos diferem quanto ao prejuízo mnemônico [38–40]. Mais estudos são necessários a fim de elucidar esse tema, todavia no presente trabalho observou-se que, ao contrário das fêmeas SHR, os animais machos não apresentam prejuízos na memória de reconhecimento durante a infância. Essas diferenças entre os achados poderiam ser explicadas pela idade dos animais utilizada neste trabalho, uma vez que os estudos sobre memória de geralmente utilizam animais adultos. Portanto, nesse trabalho verificou-se que os machos SHR jovens ainda não apresentam o déficit mnemônico observado em animais adultos, sugerindo que os processos mnemônicos nos animais modelo do TDAH sofrem alterações no decorrer do desenvolvimento.

Os estudos de neuroimagem já revelaram alterações na maturação de diversas regiões cerebrais de pacientes com TDAH, enfatizando que se trata de um transtorno do neurodesenvolvimento. Nesse trabalho, o imunoconteúdo da SHH e da GAP-43 foi analisado no bulbo olfatório, no córtex pré-frontal e no hipocampo. Essas proteínas são fundamentais para o desenvolvimento do sistema nervoso central, e alterações nas suas expressões já foram encontradas em outros transtornos neuropsiquiátricos como autismo e esquizofrenia [12,41].

Alterações na via olfatória e no bulbo olfatório também já foram relatadas em desordens psiquiátricas, incluindo o TDAH [42]. No presente estudo, a proteína SHH não apresentou alterações significativas nos seus níveis durante o início e final da infância dos animais de ambos os sexos e linhagens. Foi possível detectar um aumento no nível da GAP-43 no 22º dia pós-natal, em ambos os sexos dos animais WKY e SHR. Esse dado corrobora com o estudo de Yasui et al. (2004), em que foi verificado o aumento gradual da expressão da GAP-43 no neuroepitélio olfatório no decorrer do desenvolvimento de camundongos. No presente trabalho também foi observado que os animais SHR de ambos os sexos não aumentaram os níveis da GAP-43 no 22º dia pós-natal, diferentemente dos animais WKY.

Durante o desenvolvimento do bulbo olfatório, a GAP-43 é expressa nos axônios dos neurônios e nas células justaglomerulares [44], e é considerada um marcador de células imaturas [45]. Portanto, os níveis menores encontrados na GAP-43 no 22º dia pós-natal dos ratos SHR podem indicar um número menor de células imaturas no bulbo olfatório. Vale ressaltar que o bulbo olfatório é uma das poucas regiões encefálicas onde ocorre a neurogênese durante a vida pós-natal, pertencendo diretamente às vias migratórias onde neurônios novos se descolam a partir dali em direção a outra região encefálica como, por exemplo, o giro denteado no hipocampo [46,47]. Dessa maneira, alterações na maturação celular do bulbo olfatório podem afetar a neurogênese em outras estruturas encefálicas e a diferença de imunoconteúdo da GAP-43 nos ratos SHR no 22º dia pós-natal poderia acarretar em modificações na proliferação celular em outras regiões do SNC. De fato, já foi relatada uma diminuição na neurogênese no giro denteado de animais machos SHR adultos comparados aos controles WKY [48]. Entretanto, se faz necessária a confirmação desse desfecho sobre a neurogênese nos animais SHR da mesma idade que do nosso estudo a fim de corroborar com os achados da GAP-43 no bulbo olfatório com a alteração da proliferação celular no hipocampo dos animais SHR, contribuindo para a etiologia do TDAH.

O córtex pré-frontal está diretamente ligado a regulação das emoções, da atenção e do comportamento, estando relativamente bem fundamentado o seu envolvimento na neurobiologia do TDAH [49]. Neste estudo, não foram observadas diferenças nos níveis da SHH nos dias pós-natais analisados em ambos os sexos e linhagens. Em relação à GAP-43, se verificou um aumento no dia pós-natal 22º em relação ao 8º em ambos os sexos dos animais controles e SHR. Contudo, os animais SHR apresentaram um imunoconteúdo da GAP-43 ainda maior quando comparados aos animais WKY no período que corresponde ao final da infância. Ademais, é importante ressaltar que a GAP-43 é responsável pela plasticidade neural, regu-

lando o crescimento axonal e a formação de novas conexões entre as células, mas uma expressão aumentada pode prejudicar as sinapses e formar conexões intercelulares defeituosas [50]. Portanto, o nível mais elevado de GAP-43 nos animais SHR pode indicar a presença de déficits na comunicação neural no córtex pré-frontal durante a infância no TDAH. Os estudos de neuroimagem de pacientes com TDAH já revelaram alterações nas redes de conexão em áreas encefálicas que incluem o córtex pré-frontal [51]. A GAP-43 também foi encontrada aumentada em regiões frontais e visuais do córtex de pacientes esquizofrênicos [13].

O hipocampo é uma região encefálica essencial para os processos mnemônicos e aprendizagem, bem como déficits nessa área estão presentes em desordens neurológicas, entre elas doença de Alzheimer, depressão e epilepsia [52]. Nessa região, os níveis da GAP-43 não foram alterados durante os dias analisados em ambas linhagens e sexos. Entretanto, o imunoconteúdo da proteína SHH aumentou no 22º DPN quando comparado ao 8º DPN tanto nos animais SHR como nos controles WKY em ambos os sexos. Estudos já observaram que a SHH participa nos processos de alongação axonal no hipocampo [53], da neurogênese dos neurônios hipocámpais [54] e na regulação das células progenitoras no hipocampo de ratos adultos [55]. Portanto, o aumento do imunoconteúdo da SHH no 22º dia pós-natal observado nesse trabalho sugere uma possível alteração no processo de neurogênese e desenvolvimento neural no hipocampo dos animais WKY e SHR entre os dias pós-natais analisados. Ademais, Shetty et al., (2013) também observou um aumento de expressão da SHH na região do giro denteado do hipocampo com o passar da idade de ratos machos da linhagem Fischer 344. Entretanto, mais estudos são necessários para estabelecer uma relação causal entre as modificações nas proteínas encontradas e os desfechos comportamentais encontrados no modelo de TDAH.

## 5. Conclusão

Neste estudo, a infância do modelo animal mais validado para o estudo do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade foi investigada através de parâmetros comportamentais e neuroquímicos. Foi possível identificar alterações comportamentais em idades bastante precoces dos animais SHR, assim como diferenças no imunoconteúdo das proteínas SHH e GAP-43, importantes no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central, as quais podem estar envolvidas no desenvolvimento do transtorno. Além disso, também já foi possível observar diferenças entre os sexos dos animais SHR durante a infância, corroborando com as diferenças de sexo já estabelecidas no TDAH. Portanto, tais resultados podem contri-

buir para o melhor entendimento das bases neurobiológicas e diferenças de sexo existentes no TDAH.

## 6. Conflito de Interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse neste trabalho.

## Referências

- [1] G. V. Polanczyk, G.A. Salum, L.S. Sugaya, A. Caye, L.A. Rohde, Annual Research Review: A meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents, *J. Child Psychol. Psychiatry.* 56 (2015) 345–365. doi:10.1111/jcpp.12381.
- [2] J. Biederman, E. Mick, S. V Stephen Faraone, E. Braaten, A. Doyle, T. Spencer, T.E. Wilens, E. Frazier, B. Mary Ann Johnson, Influence of Gender on Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children Referred to a Psychiatric Clinic, *Am J Psychiatry.* 1591 (2002). <http://ajp.psychiatryonline.org/doi/pdf/10.1176/appi.ajp.159.1.36> (acessado 1 de maio de 2017).
- [3] U.P. Ramtekkar, A.M. Reiersen, A.A. Todorov, R.D. Todd, Sex and age differences in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder symptoms and diagnoses: Implications for DSM-V and ICD-11, *J Am Acad Chil Adolesc Psychiatry.* 49 (2010) 217–28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3101894/pdf/nihms291682.pdf> (acessado 1 de maio de 2017).
- [4] T. Sagvolden, V.A. Russell, H. Aase, E.B. Johansen, M. Farshbaf, Rodent Models of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, *BIOL PSYCHIATRY.* 57 (2005) 1239–1247. doi:10.1016/j.biopsych.2005.02.002.
- [5] S.K. Tayebati, D. Tomassoni, F. Amenta, Spontaneously hypertensive rat as a model of vascular brain disorder: Microanatomy, neurochemistry and behavior, *J. Neurol. Sci.* 322 (2012) 241–249. doi:10.1016/j.jns.2012.05.047.
- [6] E. El-Sayed, J.-O. Larsson, H. Persson, P. Santosh, P.-A. Rydelius, “Maturational lag” hypothesis of attention deficit hyperactivity disorder: an update, *Acta Paediatr.* 92 (2007) 776–784. doi:10.1111/j.1651-2227.2003.tb02531.x.
- [7] K. Rubia, Neuro-anatomic evidence for the maturational delay hypothesis of ADHD, *PNAS.* 104 (2007) 19663–19664. <http://www.pnas.org/content/104/50/19663.full.pdf>

- (acessado 30 de maio de 2017).
- [8] P. Shaw, K. Eckstrand, W. Sharp, J. Blumenthal, J.P. Lerch, D. Greenstein, L. Clasen, A. Evans, J. Giedd, J.L. Rapoport, Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation, *PNAS*. 104 (2007) 19649–19654. <http://www.pnas.org/content/104/49/19649.full.pdf> (acessado 30 de maio de 2017).
- [9] D. Charytoniuk, B. Porcel, J. Guez Gomez, H. Ne Faure, M. Ruat, E. Traiffort, Sonic hedgehog signalling in the developing and adult brain, *J. Physiol.* 96 (2002) 9–16. [http://ac.els-cdn.com/S0928425701000754/1-s2.0-S0928425701000754-main.pdf?\\_tid=e4b8f454-3398-11e7-9c6c-00000aacb35d&acdnat=1494211922\\_b058971a753c7c7540573619650c4b44](http://ac.els-cdn.com/S0928425701000754/1-s2.0-S0928425701000754-main.pdf?_tid=e4b8f454-3398-11e7-9c6c-00000aacb35d&acdnat=1494211922_b058971a753c7c7540573619650c4b44) (acessado 7 de maio de 2017).
- [10] C. Chiang, Y. Litingtung, E. Lee, K.E. Young, J.L. Corden, H. Westphal, P.A. Beachy, Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function, *Nature*. 383 (1996) 407–413. <https://www.nature.com/nature/journal/v383/n6599/pdf/383407a0.pdf> (acessado 17 de maio de 2017).
- [11] S.S. Patel, S. Tomar, D. Sharma, N. Mahindroo, M. Udayabanu, Targeting sonic hedgehog signaling in neurological disorders, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 74 (2017) 76–97. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.01.008.
- [12] L.Y. Al-Ayadhi, Relationship Between Sonic Hedgehog Protein, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorders, *Neurochem. Res.* 37 (2012) 394–400. doi:10.1007/s11064-011-0624-x.
- [13] N.I. Perrone-Bizzozero, A.C. Sower, E.D. Bird, L.I. Benowitz, K.J. Ivins, R.L. Neve, Levels of the growth-associated protein GAP-43 are selectively increased in association cortices in schizophrenia, *Neurobiology*. 93 (1996) 14182–14187. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19514/pdf/pq014182.pdf> (acessado 21 de maio de 2017).
- [14] C. Raineki, M.A. De Souza, R.E. Szawka, M.L. Lutz, L.F.T. De Vasconcellos, G.L. Sanvitto, I. Izquierdo, L.R. Bevilaqua, M. Cammarota, A.B. Lucion, Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: Involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb, *Neuroscience*.



- 159 (2009) 31–38. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.12.012.
- [15] K. Morgan, J. Meredith, J.-Y.A. Kuo, D.K. Bilkey, I.S. McLennan, The sex bias in novelty preference of preadolescent mouse pups may require testicular Müllerian inhibiting substance, 2011. doi:10.1016/j.bbr.2011.02.048.
- [16] J.H. McLean CA, C.W. Harley, Olfactory learning in the rat pup: A model that may permit visualization of a mammalian memory trace, *Neuroreport*. 15 (2004) 1691–1697.  
<https://pdfs.semanticscholar.org/e303/4e4e423af43f9eebba6aa73e1d26ec07beac.pdf>  
 (acessado 28 de maio de 2017).
- [17] B. Schaal, Mammary odor cues and pheromones: mammalian infant- directed communication about maternal state, mammae, and milk, in: *Vitam. Horm.*, 2010: p. 83–136. doi:10.1016/S0083-6729(10)83004-3.
- [18] K.J.S. Anand, F.M. Scalzo, Can Adverse Neonatal Experiences Alter Brain Development and Subsequent Behavior?, *Neonatology*. 77 (2000) 69–82. doi:10.1159/000014197.
- [19] A.R. Mesquita, J.M. Pêgo, T. Summavielle, P. Maciel, O.F.X. Almeida, N. Sousa, Neurodevelopment milestone abnormalities in rats exposed to stress in early life, *Neuroscience*. 147 (2007) 1022–1033. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.04.007.
- [20] M.T. Tu, R.E. Grunau, J. Petrie-Thomas, D.W. Haley, J. Weinberg, M.F. Whitfield, Maternal stress and behavior modulate relationships between neonatal stress, attention, and basal cortisol at 8 months in preterm infants, *Dev. Psychobiol.* 49 (2007) 150–164. doi:10.1002/dev.20204.
- [21] M. Alves de Souza, R. Escorsim Szawka, L. Aline Centenaro, L. Amália Diehl, A. Bolten Lucion, Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference, *Physiol. Behav.* 105 (2012) 850–855. doi:10.1016/j.physbeh.2011.10.012.
- [22] R.D.S. Prediger, D. Fernandes, R.N. Takahashi, Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats, *Behav. Brain Res.* 159 (2005) 197–205. doi:10.1016/j.bbr.2004.10.017.
- [23] E.M. Mahone, E.L. Wodka, The neurobiological profile of girls with ADHD, *Dev. Disabil. Res. Rev.* 14 (2008) 276–284. doi:10.1002/ddrr.41.

- [24] J. Waddell, M.M. McCarthy, Sexual Differentiation of the Brain and ADHD: What Is a Sex Difference in Prevalence Telling Us?, in: Springer Berlin Heidelberg, 2010: p. 341–360. doi:10.1007/7854\_2010\_114.
- [25] L. Margari, F. Craig, F. Margari, A. Legrottaglie, R. Palumbi, C. De Giambattista, A review of executive function deficits in autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 12 (2016) 1191. doi:10.2147/NDT.S104620.
- [26] N. Ahmadi, M. Ali Goodarzi, H. Hadianfard, N. Mohamadi, D. Farid, G. Kholasehzadeh, M. Nadi Sakhvidi, C. Hemyari, Birth Order and Sibling Gender Ratio of a Clinical Sample Comparing Iconic Memory in Children with and without Attention Deficit Hyperactivity Disorder, *Iran J Psychiatry.* 8 (2013) 131–137. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3887230/pdf/IJPS-8-131.pdf> (acessado 24 de maio de 2017).
- [27] A.N. Simone, D.J. Marks, A.-C. Bédard, J.M. Halperin, Low Working Memory rather than ADHD Symptoms Predicts Poor Academic Achievement in School-Aged Children, *JAbnormChild Psychol et.* (2017). doi:10.1007/s10802-017-0288-3.
- [28] P. Pandolfo, N.J. Machado, A. Köfalvi, R.N. Takahashi, R.A. Cunha, Caffeine regulates frontocorticostriatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23 (2013) 317–328. doi:10.1016/j.euroneuro.2012.04.011.
- [29] V.A. Pires, F.A. Pamplona, P. Pandolfo, D. Fernandes, R.D.S. Prediger, R.N. Takahashi, Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder, *Behav. Pharmacol.* 20 (2009) 134–145. doi:10.1097/FBP.0b013e32832a80bf.
- [30] J.F. Morici, P. Bekinschtein, N. V Weisstaub, Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents, *Behav. Brain Res.* 292 (2015) 241–251. doi:10.1016/j.bbr.2015.06.030.
- [31] M.P. Leussis, V.J. Bolivar, Habituation in rodents: A review of behavior, neurobiology, and genetics, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30 (2006) 1045–1064. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.03.006.

- [32] P. Pandolfo, N.J. Machado, A. Köfalvi, R.N. Takahashi, R.A. Cunha, Caffeine regulates frontocostriatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23 (2013) 317–328. doi:10.1016/j.euroneuro.2012.04.011.
- [33] B. Langen, R. Dost, Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animal models: effect of dopamine D1 and alpha2 agonists, *ADHD Atten. Deficit Hyperact. Disord.* 3 (2011) 1–12. doi:10.1007/s12402-010-0034-y.
- [34] D. Williamson, C. Johnston, Gender differences in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: A narrative review, *Clin. Psychol. Rev.* 40 (2015) 15–27. doi:10.1016/j.cpr.2015.05.005.
- [35] M. Wolraich, L. Brown, R. Brown, ADHD: Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents, *Pediatrics.* 128 (2011) 1007–1022. doi:10.1542/peds.2011-2654.
- [36] T.S. Nøvik, A. Hervas, S.J. Ralston, S. Dalsgaard, R.R. Pereira, M.J. Lorenzo, H. Stephen, J. Ralston, S. Dalsgaard, R.R. Pereira, Influence of gender on Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder in Europe – ADORE, *Eur Child Adolesc Psychiatry Eur. Child Adolesc. Psychiatry.* 15 (2006) i15–i24. doi:10.1007/s00787-006-1003-z.
- [37] V.A. Pires, F.A. Pamplona, P. Pandolfo, R.D.S. Prediger, R.N. Takahashi, Chronic caffeine treatment during prepubertal period confers long-term cognitive benefits in adult spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), *Behav. Brain Res.* 215 (2010) 39–44. doi:10.1016/j.bbr.2010.06.022.
- [38] B. Langen, R. Dost, Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animal models: effect of dopamine D1 and alpha2 agonists, *ADHD Atten. Deficit Hyperact. Disord.* 3 (2011) 1–12. doi:10.1007/s12402-010-0034-y.
- [39] D.T. Leffa, A. de Souza, V.L. Scarabelot, L.F. Medeiros, C. de Oliveira, E.H. Grevet, W. Caumo, D.O. de Souza, L.A.P. Rohde, I.L.S. Torres, Transcranial direct current stimulation improves short-term memory in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26 (2016) 368–377. doi:10.1016/j.euroneuro.2015.11.012.

- [40] R.D.S. Prediger, D. Fernandes, R.N. Takahashi, Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats, *Behav. Brain Res.* 159 (2005) 197–205. doi:10.1016/j.bbr.2004.10.017.
- [41] N.I. Perrone-Bizzozero, A.C. Sower, E.D. Bird, L.I. Benowitz, K.J. Ivins, R.L. Neve, Levels of the growth-associated protein GAP-43 are selectively increased in association cortices in schizophrenia, *Neurobiology.* 93 (1996) 14182–14187. <http://www.pnas.org/content/93/24/14182.full.pdf> (acessado 25 de maio de 2017).
- [42] M. Schecklmann, C. Schwenck, R. Taurines, C. Freitag, A. Warnke, M. Gerlach, M. Romanos, A systematic review on olfaction in child and adolescent psychiatric disorders, *J Neural Transm.* 120 (2013) 121–130. doi:10.1007/s00702-012-0855-2.
- [43] R. Yasui, M. Hasegawa, K. Doi, K.-I. Shimizu, N. Ohtuski, H. Ishida, K.-I. Nibu, Quantitative analysis of expression of NeuroD, GAP43 and receptor tyrosine kinase B in developing mouse olfactory neuroepithelium, *Acta Otolaryngol.* 124 (2004) 90–94. doi:10.1080/03655230410017742.
- [44] T.Y. Tsim, E.Y. K Wong, M.S. Leung, C. Wong, Expression of axon guidance molecules and their related genes during development and sexual differentiation of the olfactory bulb in rats, *Neuroscience.* 123 (2004) 951–965. doi:10.1016/j.neuroscience.2003.10.024.
- [45] L.I. Benowitz, A. Routtenberg, P.M. Edwards, P.N.E. DeGraan, A.B. Oestreicher, P. Schotman, F.G.I. Jennekins, W.H. Gispen, A membrane phosphoprotein associated with neural development, axonal regeneration, phospholipid metabolism, and synaptic plasticity, *Trends Neurosci.* 10 (1987) 527–532. doi:10.1016/0166-2236(87)90135-4.
- [46] P.-M. Lledo, M. Valley, Adult Olfactory Bulb Neurogenesis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8 (2016) a018945. doi:10.1101/cshperspect.a018945.
- [47] G. Ming, H. Song, Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system, *Annu. Rev. Neurosci.* 28 (2005) 223–250. doi:10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459.
- [48] L. Pietranera, A. Lima, P. Roig, A.F. De Nicola, Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurogenesis in Oestradiol Neuroprotection of the Hippocampus of Hypertensive Rats, *J. Neuroendocrinol.* 22 (2010) 1082–1092. doi:10.1111/j.1365-2826.2010.02058.x.

- [49] A.F.T. Arnsten, Toward a New Understanding of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder Pathophysiology, *CNS Drugs*. 23 (2009) 33–41. doi:10.2165/00023210-200923000-00005.
- [50] L. Aigner, S. Arber, J.P. Kapfhammer, T. Laux, C. Schneider, F. Botteri, H.-R. Brenner, P. Caroni, Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice, *Cell*. 83 (1995) 269–278. doi:10.1016/0092-8674(95)90168-X.
- [51] S.G. Dickstein, K. Bannon, F. Xavier Castellanos, M.P. Milham, The neural correlates of attention deficit hyperactivity disorder: an ALE meta-analysis, *J. Child Psychol. Psychiatry*. 47 (2006) 1051–1062. doi:10.1111/j.1469-7610.2006.01671.x.
- [52] P.J. Yao, R.S. Petralia, M.P. Mattson, Sonic Hedgehog Signaling and Hippocampal Neuroplasticity, *Trends Neurosci*. 39 (2016) 840–850. doi:10.1016/j.tins.2016.10.001.
- [53] P.J. Yao, R.S. Petralia, C. Ott, Y.-X. Wang, J. Lippincott-Schwartz, M.P. Mattson, Dendrosomatic Sonic Hedgehog Signaling in Hippocampal Neurons Regulates Axon Elongation, *J. Neurosci*. 35 (2015). <http://www.jneurosci.org/content/35/49/16126> (acessado 27 de maio de 2017).
- [54] G. Li, L. Fang, G. Fernández, S.J. Pleasure, The Ventral Hippocampus Is the Embryonic Origin for Adult Neural Stem Cells in the Dentate Gyrus, *Neuron*. 78 (2013) 658–672. doi:10.1016/j.neuron.2013.03.019.
- [55] K. Lai, B.K. Kaspar, F.H. Gage, D. V. Schaffer, Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo, *Nat. Neurosci*. 6 (2002) 21–27. doi:10.1038/nn983.
- [56] G.A. Shetty, B. Hattiangady, A.K. Shetty, Neural stem cell- and neurogenesis-related gene expression profiles in the young and aged dentate gyrus, *Age (Omaha)*. 35 (2013) 2165–2176. doi:10.1007/s11357-012-9507-6.

### 3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesse trabalho verificaram tanto alterações comportamentais como diferenças no padrão de expressão de proteínas envolvidas no desenvolvimento do sistema nervoso central. No 8º dia pós-natal, observou-se que no teste de preferência pelo odor materno os animais machos Wistar Kyoto não apresentaram preferência por nenhum dos dois odores disponíveis, enquanto que as fêmeas WKY preferiram a maravalha que continha o odor materno. Já os animais SHR, somente os machos apresentaram preferência pelo odor materno. No teste de reconhecimento de objeto novo, realizado no 22º dia pós-natal, os machos SHR não apresentaram prejuízo na memória de reconhecimento, ao contrário das fêmeas SHR, enquanto que ambos os sexos dos WKY apenas demonstraram uma tendência em explorar mais o objeto novo na sessão de teste. Quanto ao imunoblotting, os níveis da proteína SHH alteraram-se somente no hipocampo, onde os seus níveis aumentaram em ambos os sexos e linhagens no 22º dia pós-natal em comparação com o 8º dia pós-natal. Os níveis da proteína GAP-43 não se alteraram no hipocampo dos animais, enquanto que no bulbo olfatório foi observado um aumento em ambas linhagens e sexos no 22º dia pós-natal, sendo que nos animais SHR os níveis não aumentaram tanto quanto nos WKY. No córtex pré-frontal, os níveis da GAP-43 também se mostraram aumentados no 22º dia pós-natal, enquanto que houve um aumento ainda maior nesse dia nos animais SHR comparados aos WKY. Portanto, os dados comportamentais mostram que já é possível identificar alterações comportamentais e diferenças entre os sexos em idades bastante precoces dos animais SHR, assim como as diferenças na imunoexpressão de proteínas importantes no desenvolvimento do SNC podem contribuir para um melhor entendimento das bases neurobiológicas do TDAH.

O metilfenidato é o psicoestimulante de primeira escolha para o tratamento do TDAH, entretanto cerca de 30% dos pacientes diagnosticados não respondem bem ao tratamento. Assim, como perspectivas pretendemos investigar o efeito do tratamento com cafeína, outro psicoestimulante de consumo mundial, durante a infância dos animais SHR como terapia adjuvante ao metilfenidato no TDAH. Além disso, investiremos na técnica de imuno-histoquímica a fim de observar e localizar visualmente tais alterações nos níveis das proteínas SHH e GAP-43. Pretendemos também acompanhar outros parâmetros do desenvolvimento dos animais durante a infância, através do *Fox Test* e realizar outros testes comportamentais no 22º dia pós-natal a fim de aprofundarmos ainda mais os conhecimentos sobre as bases neurobiológicas e o desenvolvimento do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade.

## REFERÊNCIAS

- American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. 5th ed. Washington, DC: **American Psychiatric Publishing**, 2013.
- BANERJEE, S. B. et al. Recruitment of the Sonic hedgehog signalling cascade in electroconvulsive seizure-mediated regulation of adult rat hippocampal neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 1570–1580, out. 2005.
- BARKLEY, R. A.; BROWN, T. E. Unrecognized Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Adults Presenting with Other Psychiatric Disorders. **CNS Spectrums**, v. 13, n. 11, p. 977–9847, nov. 2008.
- BIERDMAN, J.; FARAONE, S. V. Attention-deficit hyperactivity disorder. **The Lancet**, v. 366, n. 9481, p. 237–248, 2005.
- BIERDMAN, J.; FARAONE, S. V.; MONUTEAUX, M. C. Differential Effect of Environmental Adversity by Gender: Rutter's Index of Adversity in a Group of Boys and Girls With and Without ADHD. **Am J Psychiatry**, v. 159, n. 9, p. 1556–1562, 2002.
- BOGDANOVIC, N. et al. Growth-associated protein GAP-43 in the frontal cortex and in the hippocampus in Alzheimer's disease: an immunohistochemical and quantitative study. **Journal of Neural Transmission**, v. 107, n. 4, p. 463–478 3 abr. 2000.
- CAO, X. et al. Abnormal resting-state functional connectivity patterns of the putamen in medication-naïve children with attention deficit hyperactivity disorder. **Brain Research**, v. 1303, p. 195–206, 2009.
- CASTELLANOS, F. X. et al. Developmental Trajectories of Brain Volume Abnormalities in Children and Adolescents With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **JAMA**, v. 288, n. 14, p. 1740, 9 out. 2002.
- CASTELLANOS, F. X.; KELLY, C.; MILHAM, M. P. The Restless Brain: Attention-Deficit Hyperactivity Disorder, Resting-State Functional Connectivity, and Intrasubject Variability. **The Canadian Journal of Psychiatr**, v. 54, p. 665–672, 2009.
- CLANCY, B.; DARLINGTON, R. B.; FINLAY, B. L. Translating developmental time across mammalian species. **Neuroscience**, v. 105, n. 1, p. 7–17, 2001.
- COOPER, O. et al. Differentiation of human ES and Parkinson's disease iPS cells into ventral midbrain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 45, n. 3, p. 258–266, nov. 2010.
- CORTESE, S. The neurobiology and genetics of Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder (ADHD): What every clinician should know. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 4, p. 422–433, 2012.
- DAS, I. et al. Hedgehog Agonist Therapy Corrects Structural and Cognitive Deficits in a Down Syndrome Mouse Model. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 201, 2013.

DASS, B. et al. Behavioural and immunohistochemical changes following supranigral administration of sonic hedgehog in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated common marmosets. **Neuroscience**, v. 114, n. 1, p. 99–109, 2002.

DUTKA, T.; HALLBERG, D.; REEVES, R. H. Chronic up-regulation of the SHH pathway normalizes some developmental effects of trisomy in Ts65Dn mice. **Mechanisms of Development**, v. 135, p. 68–80, 2015.

EL-SAYED, E. et al. “Maturation lag” hypothesis of attention deficit hyperactivity disorder: an update. **Acta Paediatrica**, v. 92, n. 7, p. 776–784, 2 jan. 2007.

FAIR, D. A. et al. Atypical Default Network Connectivity in Youth with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 12, p. 1084–1091, 2010.

FARAONE, S. V.; BIEDERMAN, J.; MICK, E. The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. **Psychological Medicine**, v. 36, p. 159–165, 2006.

FAYYAD, J. et al. The descriptive epidemiology of DSM-IV Adult ADHD in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders**, v. 9, n. 1, p. 47–65, 19 mar. 2017.

FELDMAN, H. M.; REIFF, M. I. Attention Deficit–Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents. **N Engl J Med**, v. 370, p. 838–46, fev. 2014.

FENG, S. et al. Sonic hedgehog is a regulator of extracellular glutamate levels and epilepsy. **EMBO Reports**, v. 17, p. 682–694, 2016.

GENRO, J. P. et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 10, n. 4, p. 587–601, 9 abr. 2010.

HALMØY, A. et al. Pre- and Perinatal Risk Factors in Adults with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 5, p. 474–481, 2012.

HENRIKSEN, L. et al. Medical Augmentation of Labor and the Risk of ADHD in Offspring: A Population-Based Study. **Pediatrics**, v. 135, 2015.

KESSLER, R. C. et al. The Prevalence and Correlates of Adult ADHD in the United States: Results From the National Comorbidity Survey Replication. **Am J Psychiatry**, 2006. v. 1634, 2006.

LANGLEY, K. et al. Maternal and Paternal Smoking During Pregnancy and Risk of ADHD Symptoms in Offspring: Testing for Intrauterine Effects. **American Journal of Epidemiology**, v. 176, n. 3, p. 261–268, 1 ago. 2012.

LONG, F. et al. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 24, p. 5099–108, dez. 2001.



- MAIER, D. L. et al. Disrupted cortical map and absence of cortical barrels in growth-associated protein (GAP)-43 knockout mice. **Neurobiology**, v. 96, p. 9397–9402, 1999.
- MANNUZZA, S. et al. Impact of the Impairment Criterion in the Diagnosis of Adult ADHD: 33-Year Follow-Up Study of Boys With ADHD. **Articles Journal of Attention Disorders**, v. 15, n. 2, p. 122–129, 2011.
- MARCO, E. M. et al. Neurobehavioral adaptations to methylphenidate: The issue of early adolescent exposure. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 1722–1739, 2011.
- OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. **Japanese Circulation Journal**, 1963. v. 27, n. 3, p. 282–293, 1963.
- RUBIA, K. Neuro-anatomic evidence for the maturational delay hypothesis of ADHD. **PNAS**, 2007. v. 104, n. 50, p. 19663–19664, 2007.
- SAGVOLDEN, T. 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, dez. 2009.
- SHAW, P. et al. Longitudinal Mapping of Cortical Thickness and Clinical Outcome in Children and Adolescents With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 5, p. 540, 1 maio. 2006.
- SILVA, D. et al. Environmental Risk Factors by Gender Associated With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Pediatrics**, v. 133, n. 1, 2014.
- SIMCHON, Y.; WEIZMAN, A.; REHAVI, M. The effect of chronic methylphenidate administration on presynaptic dopaminergic parameters in a rat model for ADHD. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 10, p. 714–720, mai. 2010.
- STRITTMATTER, S. M. et al. Neuronal Pathfinding Is Abnormal in Mice Lacking the Neuronal Growth Cone Protein GAP-43. **Cell**, v. 80, p. 445–452, 1995.
- TCHEKALAROVA, J.; KUBOVA, H.; MAREŠ, P. Postnatal caffeine exposure: effects on motor skills and locomotor activity during ontogenesis. **Behavioural Brain Research**, v. 160, p. 99–106, 2005.
- TEUNISSEN, C. E. et al. Growth-associated protein 43 in lesions and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 32, n. 3, p. 318–331, jun. 2006.
- TRAIFFORT, E. et al. Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 9, p. 3199–3214, set. 1999.
- TRAIFFORT, E.; ANGOT, E.; RUAT, M. Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, n. 3, p. 576–590, maio 2010.
- TSUBOI, K.; SHULTS, C. W. Intrastratial Injection of Sonic Hedgehog Reduces Behavioral

Impairment in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Experimental Neurology**, v. 173, n. 1, p. 95–104, set. 2002.

VALERA, E. M. et al. Meta-Analysis of Structural Imaging Findings in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 12, p. 1361–1369, 2007.

VOLKOW, N. D. et al. Relationship between blockade of dopamine transporters by oral methylphenidate and the increases in extracellular dopamine: Therapeutic implications. **Synapse**, v. 43, n. 3, p. 181–187, 1 mar. 2002.

WILLIAMS, G. R. Neurodevelopmental and Neurophysiological Actions of Thyroid Hormone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 784–794, jun. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. Int Classif; 10: 1–267, 1992.

## ANEXO I – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH

### Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

### Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guide-

lines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. More information.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### ***Article transfer service***

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

## Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

### *Author rights*

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

## Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### *Funding body agreements and policies*

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

## Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

### *Open access*

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

### *Subscription*

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

#### *Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### *Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 18 months.

### ***Elsevier Publishing Campus***

The Elsevier Publishing Campus ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### ***Submission Address***

<https://www.evise.com/evise/jrnl/BBR>

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

### ***Use of word processing software***

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

## **Article structure**

### ***Length Of Article***

Original Research Articles should not exceed 12,000 words (inclusive of abstract, references, and figure legends).

Short communications should not exceed 3500 words (inclusive of abstract, references, and figure legends) and should not be divided into sections. No more than 25 references and four figures or tables should be included.

### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### ***Material and methods***

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### ***Results***

Results should be clear and concise.

### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### ***Conclusions***

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### ***Appendices***

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## **Essential title page information**

- ***Title.***



Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• ***Author names and affiliations.***

Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• ***Corresponding author.***

Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• ***Present/permanent address.***

If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

**Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

**The Abstract should not exceed 250 words**

***Graphical abstract***

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts on our information site](#). Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best

presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

### ***Highlights***

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### ***Abbreviations***

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### ***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### ***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Artwork**

#### ***Electronic artwork***

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

##### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically

have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### **References**

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagina-

tion may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### ***References in a special issue***

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### ***Reference management software***

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:<http://open.mendeley.com/use-citation-style/behavioural-brain-research> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

## ***Reference formatting***

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### ***Reference style***

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### ***Examples:***

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.  
Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.  
<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak

wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015.  
<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

## **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

## **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

## **RESEARCH DATA**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

### ***Data linking***

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described. There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page. For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect. In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### ***Mendeley data***

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

### ***Data in Brief***

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

### ***Transparency***

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, this gives you the opportunity to indicate why. If you submit this form with your manuscript as a supplementary file, the statement will appear next to your published article on ScienceDirect.

## **ARTICLE ENRICHMENTS**

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in



their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **3D neuroimaging**

You can enrich your online articles by providing 3D neuroimaging data in NIfTI format. This will be visualized for readers using the interactive viewer embedded within your article, and will enable them to: browse through available neuroimaging datasets; zoom, rotate and pan the 3D brain reconstruction; cut through the volume; change opacity and color mapping; switch between 3D and 2D projected views; and download the data. The viewer supports both single (.nii) and dual (.hdr and .img) NIfTI file formats. Recommended size of a single uncompressed dataset is maximum 150 MB. Multiple datasets can be submitted. Each dataset will have to be zipped and uploaded to the online submission system via the '3D neuroimaging data' submission category. Please provide a short informative description for each dataset by filling in the 'Description' field when uploading a dataset. Note: all datasets will be available for downloading from the online article on ScienceDirect. If you have concerns about your data being downloadable, please provide a video instead. More information.

### **Interactive plots**

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their

article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.