



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MONIQUE VIEIRA RIBEIRO

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO METILFENIDATO E
DA REBOXETINA EM MODELO ANIMAL DE DÉFICIT DE
ATENÇÃO INDUZIDO PELA LESÃO POR ETANOL
EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2008

MONIQUE VIEIRA RIBEIRO

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO METILFENIDATO E
DA REBOXETINA EM MODELO ANIMAL DE DÉFICIT DE
ATENÇÃO INDUZIDO PELA LESÃO POR ETANOL
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida a Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Geanne Matos de Andrade

FORTALEZA

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Ceará
©reprodução autorizada pelo autor

R37e Ribeiro, Monique Vieira

Efeitos comportamentais do metilfenidato e da reboxetina em modelo animal de déficit de atenção induzido pela lesão por etanol em camundongos/ Monique Vieira Ribeiro. Fortaleza, 2008.

102 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Geanne Matos de Andrade.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Etanol. 2. Metilfenidato. 3. Atenção. 4. Memória.
5. Camundongos. I. Cunha, Geanne Matos de Andrade. (orient.).
II. Título.

CDD 615.1

MONIQUE VIEIRA RIBEIRO

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO METILFENIDATO E
DA REBOXETINA EM MODELO ANIMAL DE DÉFICIT DE
ATENÇÃO INDUZIDO PELA LESÃO POR ETANOL
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada a Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Geanne Matos de Andrade
(Orientadora)

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro da Costa
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr^a. Valéria Barreto Novais e Souza

Prof. Dr. Francisco de Assis Aquino Gondim
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

A Deus por Sua infinita misericórdia, por guiar meus passos e meus pensamentos e me dar forças na caminhada na vida.

Ao meu pai, Cleyton Ribeiro, de quem herdei o amor pela medicina e pelo ensinar, por sua presença constante, seus ensinamentos, paciência, amor e confiança.

À minha mãe, Elienita Ribeiro, meu exemplo de mulher, por seu incansável apoio, amor e carinho, por sua perseverança e inteligência, seu espírito guerreiro e humor, por ter sonhado e realizado junto comigo e por ter feito de seus dois filhos pessoas de bem.

Ao meu irmão querido, Cleyton Filho, pelo apoio constante, pelo carinho e compreensão nas minhas ausências, pelo meu sobrinho Sérgio (que torna minha vida mais doce) e minha cunhada Monik.

Às minhas avós Luiza e Zulmirinha, em especial ao meu avô Elias (*in memoriam*) de quem SEMPRE sentirei saudades. Por seu apoio, benevolência, amor e compreensão, por torcerem por mim e me compreenderem sempre.

Aos meus tios e tias, primos e primas, em especial às tias Maria, Ana e Lys, por estarem sempre presentes em minha vida e por todo o seu apoio e amor.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Geanne Matos de Andrade, por acreditar em mim e me apoiar apesar de todas as dificuldades, pelo amor que tem ao ensino e à pesquisa, pela ética, garra, humor e alegria e por, acima de tudo, endurecer sem nunca perder a ternura. Nada disso teria sido possível sem a sua ajuda, colaboração e persistência. Meu carinho, minha admiração, meu respeito e meu muito obrigada!

À Dr^a. Valéria Barreto Novais e Souza, mãe que a vida me deu de presente, pelo carinho, garra e força de vontade, pelos seus ensinamentos, pelo exemplo de profissionalismo, por acreditar em mim mesmo quando eu já não o fazia, pelo Fábio Jr., Bruno e Rafael.

Ao Prof. Dr. Fábio Gomes de Matos e Souza, com quem aprendi a amar a psiquiatria, pela paixão com que ensina e por ter incentivado em mim o gosto pela ciência.

À Dr^a. Isa Kabacznik, exemplo de superação e sucesso, pelo carinho com que sempre me recebe, por acreditar sempre que é possível e por nunca se conformar com menos. Com todo o meu carinho, respeito e admiração.

Aos Amigos Bruno Brito, Bruno Benevides, Lícia e Geórgia, pois sem vocês, não haveria dissertação, pela ajuda efetiva e essencial, pelas noites em claro comigo e por mim, pelo carinho e pela amizade. Meu muito obrigada!

Às amigas Vanessa, Verônica, Natalie e Ana Flávia e aos amigos Breno e Jerônimo por acreditarem que tudo seria possível, por me ouvirem, me acalentarem e me encorajarem sempre. Por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos Colegas de Laboratório: Danielle, Carolina, Rose, Aílton, Flávio, e Hélio pela convivência harmoniosa, paciência e colaboração neste trabalho.

Aos estudantes de graduação do Laboratório de Neurofisiologia e Comportamento, em especial às minhas bolsistas Camylla e Tatiana por seu trabalho árduo e competente, muitas vezes na minha ausência. Sem vocês não haveria uma dissertação.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial Vilani e Jaqueline, por toda sua paciência e amizade, pela ajuda e ensinamentos.

As Secretárias do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial à **Aura Rhanes**, pelo carinho, paciência, disponibilidade e eficiência.

Ao CNPq, por ter colaborado financeiramente durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

To Dr. Kenneth L. Matthews, Director of the University of Texas Health Science Center Psychiatry Training Program, for all the encouragement and for allowing me to come abroad to complete this work. I deeply appreciate!

To all my attendings, specially to Drs. Talley, T. Matthews, Braid, Brown, Timmerman, Istafanous and Salazar for all the support and teaching during these first two years.

To Yvette, Elida and Susan from the residency coordination, for all their hard work and help.

To my dear friends Kirstin, Nicole and Paulette. Without their support, listening and encouragement, this work would not have been possible.

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é uma desordem do desenvolvimento neurocomportamental que afeta de 3 a 5% das crianças em idade escolar. O transtorno é caracterizado pela presença de sintomas como desatenção, hiperatividade e impulsividade. Crianças expostas ao álcool durante o período gestacional exibem um padrão de hiperatividade, déficit de linguagem e aprendizado. A Dopamina e a Noradrenalina parecem ter um papel primário na gênese do transtorno, o que é confirmado pela resposta ao psicoestimulantes que aumentam suas quantidades na fenda sináptica. O psicoestimulante Metilfenidato é a droga de primeira escolha no tratamento do TDAH. Medicamentos não-psycoestimulantes como o inibidor da recaptção de noradrenalina Reboxetina, têm ganhado força como possível alternativa no tratamento do déficit de atenção. Em ratos, o etanol administrado no período de neurodesenvolvimento gera disfunção em circuitos pré-frontais, levando a transmissão dopaminérgica anormal. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos comportamentais (memória, atenção, atividade locomotora, depressão e ansiedade) do Metilfenidato (MFD) e da Reboxetina (RBX) em modelo de déficit de atenção induzido em camundongos pela lesão por etanol. Camundongos Swiss machos e fêmeas no 10º dia de vida foram submetidos a injeção de etanol (2 x 2,5g/kg, s.c., 6 h-intervalo) ou solução salina (mesmo volume). No 30º dia, iniciaram-se testes comportamentais (*T-maze*, *Y-Maze*, esquiwa passiva, nado-forçado, *plus-maze*, caixa claro-escuro e campo-aberto). Os animais receberam MFD (2,5mg/kg) ou RBX (10 mg/kg) por gavagem 30 minutos antes de cada sessão de testes. Não se observaram alterações histopatológicas em cortes de córtex cerebral dos camundongos lesados por etanol. No ***T-Maze***, o grupo do etanol apresentou significativos ($p < 0,001$, Teste de Kruskal-Wallis) déficits de atenção, necessitando de mais sessões para aprender. Os déficits foram revertidos pelo MFD e pela RBX. (Cont. $1,5 \pm 0,32$, Et $7,18 \pm 0,32$, MFD+Et $3,14 \pm 0,88$, RBX+Et $1,55 \pm 0,33$). Na fase de discriminação tardia, os animais lesados também apresentaram déficits de memória, com menor número de acertos quando comparados aos controles. O efeito revertido pelo MFD, mas não pela RBX. (Cont. $25,78 \pm 0,86$, Et $21,27 \pm 1,02$, MFD+Et $25,14 \pm 1,03$, RBX+Et $21,88 \pm 1,00$) Não houve déficits de memória aversiva na **Esquiwa Passiva**. No ***Y-Maze***, o grupo do etanol apresentou déficits de memória de trabalho, revertidos pelo MFD, mas não por RBX. (Cont. $73,28 \pm 4,75$, Et $43,53 \pm 4,65$, MFD+Et $60,57 \pm 1,92$, RBX+Et $54,63 \pm 2,80$). No **Campo Aberto**, o grupo do etanol teve hipoatividade motora, o que foi mitigado por MFD e RBX (Cont. $93,59 \pm 6,38$, Et $66,52 \pm 5,87$, MFD+Et $98,14 \pm 9,23$, RBX+Et $77,3 \pm 7,68$) No **Claro-Escuro**, o grupo do etanol mostrou comportamento ansiogênico, permanecendo menos tempo no claro, o que foi revertido pela RBX. (Cont. $149 \pm 5,99$, Et $115,4 \pm 4,27$, MFD+Et $120,1 \pm 6,81$, RBX+Et $149,1 \pm 2,55$). No **Plus-Maze**, o grupo etanol apresentou comportamento ansiogênico, revertido pela RBX, mas não pelo MFD (Cont. $88,06 \pm 12,52$, Et $50,53 \pm 5,99$, MFD+Et $39,86 \pm 12,00$, RBX+Et $86,29 \pm 9,49$). No **Nado-Forçado**, o grupo do etanol teve um comportamento depressivo que não foi melhorado por MFD ou RBX (Cont. $74,17 \pm 23,43$, Et $141,8 \pm 19,3$, MFD+Et $178,9 \pm 12,43$, RBX+Et $118,5 \pm 18,25$). Concluímos que camundongos lesados por etanol no período neonatal apresentam déficits de atenção e memória que são adequadamente revertidos por MFD. A RBX permanece como droga de segunda escolha, principalmente em casos onde existem comorbidades como ansiedade.

Palavras chave: Etanol. Metilfenidato. Atenção. Memória. Camundongos.

ABSTRACT

Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD) is a neurobehavioral disorder that affects between 3 - 5% of scholar-aged children. The disorder is characterized by inattention, hyperactivity and impulsivity. Children exposed to alcohol during pregnancy may exhibit hyperactivity, language and learning deficits. Dopamine and Norepinephrine seem to have an important role in the pathophysiology, which is confirmed by the response to psychostimulants, which increase the availability of these neurotransmitters in the synaptic cleft. The psychostimulant Methylphenidate is the gold-standard in the treatment of ADHD. Non-stimulant medications, such as norepinephrine reuptake inhibitor Reboxetine are gaining space as an alternative in the treatment of ADHD. In rats, when ethanol is given during the period of brain development, it may cause pre-frontal circuits' dysfunction and abnormal dopaminergic transmission. The aim of this work is to evaluate the behavioral effects (attention, memory, motor activity, anxiety and depression) of Methylphenidate (MPH) and Reboxetine (RBX) in an experimental model of attention deficit induced by ethanol in mice. Male and female Swiss mice on the post-natal day 10 were injected with ethanol (2 x 2,5g/kg, s.c., 6 h-interval) or saline (same volume). On post-natal day 30, behavioral testing was started (*T-maze*, *Y-maze*, passive avoidance, forced swim test, open field, plus maze and dark/light box). The subjects received either MPH (2,5mg/kg) or RBX (10 mg/kg) p.o, 30 minutes before each test session. There were no histopathologic changes in cerebral cortex of mice that received ethanol. In the *T-maze*, ethanol subjects had significant attention deficits, taking a longer time to learn, but these were reversed by MPH and RBX (Cont. 1,5±0,32, Et 7,18±0,32, MPH+Et 3,14±0,88, RBX+Et 1,55±0,33). During delayed discrimination, ethanol group had memory deficits, with fewer correct choices than controls. MPH ameliorated the deficits, but RBX did not (Cont. 25,78±0,86, Et 21,27±1,02, MPH+Et 25,14±1,03, RBX+Et 21,88±1,00). There were no deficits in aversive memory during passive avoidance test. In the *Y-Maze*, ethanol subjects had working memory deficits, that were mitigated MPH, but not by RBX. (Cont. 73,28±4,75, Et 43,53±4,65, MPH+Et 60,57±1,92, RBX+Et 54,63±2,80). At the open field, ethanol subjects had motor hypoactivity that was reversed by MPH and RBX (Cont. 93,59±6,38, Et 66,52±5,87, MPH+Et 98,14±9,23, RBX+Et 77,3±7,68). At the Light/dark paradigm, ethanol subjects displayed anxious behavior, remaining more time in the dark side and this behavior was reversed by RBX only (Cont. 149±5,99, Et 115,4±4,27, MPH+Et 120,1±6,81, RBX+Et 149,1±2,55). At the *Plus-Maze*, ethanol subjects had an anxiogenic behavior, remaining less time in the open arms, and this effect was reversed by RBX (Cont. 88,06±12,52, Et 50,53±5,99, MPH+Et 39,86±12,00, RBX+Et 86,29±9,49). At the forced swimming test, ethanol subjects had prolonged immobility, which was not reversed by MPH or RBX (Cont. 74,17±23,43, Et 141,8±19,3, MPH+Et 178,9±12,43, RBX+Et 118,5±18,25). In conclusion, mice exposed to ethanol during brain development have attention and memory deficits that are reversed by MPH and partially by RBX. RBX may be used as a second line treatment in subjects that do not respond to stimulants or have comorbid anxiety.

Key Words: Attention. Memory. Methylphenidate. Mice. Anxiety.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	=	Alfa
Γ	=	Gama
±	=	Mais ou menos
>	=	Maior que
<	=	Menor que
%	=	Porcentagem
6-OHDA - 6-hidroxi	=	Dopamina
5HT	=	Serotonina
5HTR	=	Receptor de Dopamina
5HTT	=	Transportador de Serotonina
TDAH	=	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
TC	=	Transtorno de Conduta
TOD	=	Transtorno Opositor Desafiador
COMT	=	Catecol-O-Metil-Transferase
SPECT	=	Single Proton Emission Computed Tomography
SFA	=	Síndrome Fetal Alcoólica
DA	=	Dopamina
GABA	=	Ácido γ amino butírico
VTA	=	Área ventral tegmental
PFC	=	Córtex pré-frontal
SNc	=	Substância Nigra pars compacta
DAT	=	Transportador de dopamina
Nac	=	Núcleo Accumbens
MPH	=	Metilfenidato
MFD	=	Metilfenidato

Dopa	=	Dihidrofenilalanina
D	=	receptor dopaminérgico
NAT	=	Transportador de Noradrenalina
NMAD	=	N-metil-D-aspartato
CSTC	=	córtico-estriatatis-talâmico-corticais
DLPFC	=	Córtex pré-frontal dorso-lateral
LCM	=	lesão cerebral mínima
TCA	=	antidepressivos triciclicos
MAO	=	monoamino oxidase
NET	=	transportador de Noradrenalina
SHR	=	ratos espontaneamente hipertensos
NHE	=	ratos naples altamente excitáveis
Seg	=	Segundos
Et	=	Etanol
Cont	=	Controles
RBX	=	Reboxetina
DAT-KO	=	ratos <i>knock out</i> do transportador de dopamina
Vs	=	Versus
EPM	=	Erro padrão da média
Mg	=	Miligrama
G	=	Gramma
Kg	=	Quilograma
N	=	Número

LISTA DE TABELAS

- 1 Avaliação de ansiedade no teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*). Valores expressos em média \pm EPM e percentagem, número de animais expostos entre parênteses..... 67

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura do Metilfenidato.....	30
2	Estrutura da Reboxetina.....	33
3	Principais áreas envolvidas na formação de memórias declarativas de curta e de longa duração, e suas principais conexões (linhas vermelhas mostram a interconexão entre as áreas cerebrais, e as demais linhas mostram a ação dos neurotransmissores sobre as mesmas áreas cerebrais).....	38
4	Labirinto em cruz elevado (“ <i>Plus-Maze</i> ”).....	44
5	Aparelho de Esquiva Passiva.....	45
6	Arena do Campo Aberto.....	46
7	Cortes histológicos de córtex cerebral de camundongos.....	49
8a	Influência do sexo no aprendizado de camundongos lesados por etanol e controles no Teste do <i>T-Maze</i>	51
8b	Efeito do tratamento diário com Metilfenidato ou Reboxetina na atenção durante a fase de aquisição de discriminação de animais no Teste do <i>T-Maze</i>	52
8c	Efeito do tratamento diário com Metilfenidato ou Reboxetina na memória de trabalho durante a fase de discriminação tardia no Teste do <i>T-Maze</i>	53
9a	Efeito do tratamento diário com Metilfenidato na aquisição da memória aversiva de camundongos submetidos a lesão por etanol no Teste da Esquiva Passiva.....	55
9b	Efeito do tratamento diário com Reboxetina na aquisição da memória aversiva de camundongos (n=10) submetidos a lesão por etanol no Teste da Esquiva Passiva.....	56
10	Efeito do tratamento agudo com Metilfenidato ou Reboxetina na aquisição da memória de trabalho de camundongos submetidos a lesão por etanol no Teste do <i>Y-Maze</i>	58
11a	Efeito do tratamento agudo com Metilfenidato na atividade locomotora de camundongos submetidos à lesão por etanol no Teste de Campo Aberto.....	60

11b	Efeito do tratamento agudo com Reboxetina na atividade locomotora de camundongos submetidos à lesão por etanol no Teste de Campo Aberto.....	61
12a	Efeito da lesão por etanol no tempo de latência no Teste do Claro-Escuro.....	63
12b	Efeito do tratamento agudo com Metilfenidato ou Reboxetina na ansiedade de camundongos lesados por etanol no Teste do Claro-Escuro.....	64
12c	Efeito do tratamento agudo com Metilfenidato ou Reboxetina na atividade locomotora de camundongos lesados por etanol no Teste do Claro-Escuro.....	65
13	Avaliação de depressão em camundongos submetidos à lesão por etanol no Teste do Nado Forçado.....	69

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Déficit de atenção	16
1.2	Genética e déficit de atenção	18
1.3	Fatores ambientais e déficit de atenção	20
1.4	Vias centrais envolvidas com o TDAH	22
1.5	Neurobiologia do TDAH	27
1.6	Tratamentos do TDAH	29
1.7	Reboxetina	32
1.8	Modelos para o estudo do déficit de atenção	33
1.9	Memória e TDAH	36
2	JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	Geral	40
3.2	Específicos	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Animais	41
4.2	Drogas	41
4.3	Grupos experimentais	42
4.4	Modelo de déficit de atenção induzido pela lesão por etanol	42
4.5	Tratamento	42

4.6	Testes comportamentais	43
4.6.1	Ansiedade - Teste “ <i>plus maze</i> ”.....	43
4.6.2	Depressão - Modelo experimental nado forçado.....	44
4.6.3	Memória Aversiva - Esquiva passiva (<i>Passive avoidance test</i>).....	44
4.6.4	Avaliação da atividade locomotora (teste do Campo Aberto).....	46
4.6.5	Avaliação da atividade e performance motora e ansiedade (Caixa Claro-Escuro).....	47
4.6.6	Avaliação da memória de trabalho imediata – Teste do <i>Y-Maze</i>	47
4.6.7	Avaliação da atenção e memória – Teste do <i>T-Maze</i>	47
4.7	Análise estatística	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Análise histológica dos efeitos da lesão por etanol em camundongos ...	49
5.2	Efeito do tratamento diário com Metilfenidato ou Reboxetina na atenção e memória de camundongos submetidos à lesão por etanol no teste <i>T-maze</i>	50
5.3	Efeito do Metilfenidato ou Reboxetina na aquisição da memória aversiva de camundongos submetidos à lesão por etanol no teste Esquiva Passiva	54
5.4	Efeito do tratamento com Metilfenidato ou Reboxetina na aquisição da memória de trabalho de camundongos submetidos à lesão por etanol no teste do <i>T-maze</i>	57
5.5	Efeito do Metilfenidato e da Reboxetina na atividade locomotora de camundongos submetidos à lesão por etanol no Teste de Campo Aberto	59
5.6	Efeito do tratamento com Metilfenidato ou Reboxetina na ansiedade de camundongos lesados por etanol no Teste do Claro-Escuro	62
5.7	Efeito do Metilfenidato e da Reboxetina na ansiedade de camundongos lesados pelo etanol no teste do <i>Plus Maze</i>	66
5.8	Efeito do tratamento com Metilfenidato ou Reboxetina na depressão em camundongos submetidos à lesão por etanol no Teste do Nado Forçado	68
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Déficit de atenção

O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é uma desordem cognitiva e do desenvolvimento neurocomportamental que afeta aproximadamente 3 a 5% das crianças em idade escolar (BARKLEY, 1997). Esta porcentagem é apenas uma estimativa, já que estudos epidemiológicos recentes indicam que o número pode ser duas a três vezes maior (ROWLAND *et al.*, 2001). Segundo a Associação Psiquiátrica Americana, é atualmente o transtorno neurocomportamental mais diagnosticado em crianças mundialmente (DSM-IV-TR: American Psychiatric Association - APA, 2000). Está associado a prejuízo em todas as esferas de vida da criança, adolescente ou adulto, i.e. familiar, acadêmica ou profissional e social (DSM-IV: American Psychiatric Association - APA, 1994; BUSCH *et al.*, 2002). Crianças com Déficit de Atenção frequentemente mantêm uma trajetória negativa de desenvolvimento (BIEDERMAN *et al.*, 1996) e os prejuízos podem continuar ao longo da adolescência e vida adulta (BIEDERMAN, 2005).

O TDAH é uma preocupação para a saúde pública e seus gestores, não apenas devido ao alto grau de dificuldades associadas ao transtorno, mas também ao substancial impacto econômico para a sociedade em termos de custos com tratamento médico (LEIBSON *et al.*, 2001) e custos indiretos relacionados a comportamentos de alto risco (SHEKIM *et al.*, 1990; BIEDERMAN *et al.*, 1993) e suas conseqüências. A ocorrência simultânea de TDAH e uso de substâncias psicoativas (abuso ou dependência de álcool e drogas) tem sido demonstrada em ambientes experimentais ou estudos clínicos (BIEDERMAN *et al.*, 2008). Estudos de seguimento têm demonstrado um risco maior que o esperado para abuso e dependência de substância em adultos que tiveram TDAH na infância do que em controles (HECHTMAN e WEISS, 1986; MANNUZZA *et al.*, 1991).

A identificação precoce das possíveis causas e tratamentos eficazes são então de grande importância para o planejamento das ações de saúde nos serviços públicos.

O transtorno é caracterizado pela presença de sintomas como hiperatividade, dificuldades em manter o foco de atenção, distractibilidade e impulsividade (DSM-IV-TR: American Psychiatric Association - APA, 2000). O diagnóstico é feito através de critérios clínicos e escalas de avaliação. Dentre os mais utilizados e cientificamente validados estão os critérios do DSM - Manual Diagnóstico Estatístico, publicado pela American Psychiatric Association (APA). A escala consiste em nove sintomas de desatenção e nove sintomas de hiperatividade-impulsividade. Para que se faça o diagnóstico, devem estar presentes pelo menos seis sintomas de desatenção e/ou seis sintomas de hiperatividade-impulsividade. Estes sintomas devem aparecer antes dos sete anos de idade e permanecer por pelo menos seis meses. Além disso, é necessário que os sintomas causem significativo prejuízo funcional em dois ou mais ambientes, isto é, casa, escola ou trabalho e vida social. O DSM divide o Transtorno do déficit de Atenção em três subtipos clínicos: Predominantemente Desatento, Predominantemente Hiperativo-Impulsivo e Combinado.

É importante compreender-se que o TDAH não é uma desordem isolada, mas o ponto final de um espectro de auto-controle, onde um extremo representa hipoatividade/hiperatenção e o outro hiperatividade/desatenção (RAMUSSEN *et al.*, 2002; ROHDE *et al.*, 2001). O diagnóstico pode refletir apenas um ponto de corte arbitrário a partir do qual as características passam a ser consideradas patológicas. Embora a maioria dos indivíduos com TDAH tenha tanto sintomas de desatenção como de hiperatividade/impulsividade, existem indivíduos em que apenas um dos sintomas é predominante (WALLIS *et al.*, 2008).

Conforme demonstram Millsteim *et al.* (1997), crianças, adolescentes e adultos portadores do Transtorno do Déficit de Atenção têm dificuldades em executar tarefas que envolvam freqüentes mudanças de focos de atenção, atenção mantida por um período de tempo mais prolongado ou simplesmente em seguir instruções. Em adultos, são mais proeminentes problemas de organização, planejamento, utilização do tempo e memória. No subtipo hiperativo, há ainda inquietação, hiperatividade motora e impulsividade, levando a decisões precipitadas, respostas prematuras e labilidade emocional.

A desordem não é exclusiva da infância e, embora a hiperatividade diminua com o tempo, a maioria dos pacientes continua a sofrer com suas conseqüências na adolescência e

vida adulta (FARAONE *et al.*, 2000). Com a progressão da idade, os sintomas de hiperatividade tendem a diminuir, persistindo a desatenção, que se torna mais proeminente.

Parece haver um predomínio do transtorno em meninos em relação a meninas (SZATMARI *et al.*, 1989). Em verdade, o número de meninos diagnosticados excede o de meninas numa razão que varia de três a nove meninos para cada menina (SWANSON *et al.*, 1998). O tipo de sintomas encontrado poderia resultar neste viés diagnóstico no que diz respeito às diferenças entre sexos (LAHEY *et al.*, 1994). As meninas costumam apresentar mais o subtipo desatento, enquanto meninos são mais frequentemente hiperativos, fazendo com que sejam mais facilmente diagnosticados e referidos aos serviços de saúde. Biederman *et al.* (2005) sugerem que os correlatos clínicos do TDAH não são influenciados por gênero e que as diferenças em grupos atendidos na prática clínica podem ser causadas por vieses de referência.

Adicionando mais dificuldades ao diagnóstico do transtorno, o TDAH está frequentemente presente junto a outros diagnósticos, como transtornos de conduta (TC) e opositor-desafiador (TOD), além das chamadas desordens internalizadoras como depressão, ansiedade, dependência química e transtornos de aprendizado (BIEDERMAN *et al.*, 1992). No geral, até 65% das crianças com TDAH terão uma ou mais comorbidades. Entre 10 e 20% têm transtornos de humor, 20% têm transtorno de conduta (BIEDERMAN, NEWCORN e SPRICH, 1991) e 30 a 45% tem TOD (WALLIS *et al.*, 2008).

1.2 Genética e déficit de atenção

A etiologia da desordem não é completamente compreendida, sugerindo-se uma complexa interação genética, ambiental e de fatores neurofisiológicos (RAPPORT *et al.*, 2000; PALOMO *et al.*, 2003). Evidências crescentes suportam a transmissão familiar, com provável componente de hereditariedade (VOELLER, 1994). Isto também é refletido pelas associações entre irmãos (FARAONE *et al.*, 1995), pais (FRICK *et al.*, 1995) e mães (SCHACHER e WACHSMUTH, 1990; FARAONE *et al.*, 2003).

As taxas de concordância entre gêmeos para TDAH variam de 60% (SHERMAN *et al.*, 1997) a 100% (LOPEZ *et al.*, 1965). Um estudo de adoção realizado por Sprich *et al.*

(2000) indicou que correlações biológicas têm um impacto significativamente maior na desordem (irmãos: 32%; pais: 18%) do que as adotivas (irmãos: 8%; pais: 7%) ou controles (irmãos: 7%; pais: 3%).

Compreender o exato envolvimento de vários genes na fisiopatologia do transtorno, no entanto, não é tarefa fácil. Dois genes específicos suportam a importância da disfunção do sistema dopaminérgico na gênese do TDAH. Estes codificam para o transportador de dopamina (SLC6A3) e para os receptores de dopamina, principalmente do subtipo D4. Estudos de genética molecular em vários *loci* gênicos, como os do transportador de dopamina (DAT) e dos receptores de dopamina (DRD1, DRD2, DRD4), nos aproximam tanto do entendimento dos mecanismos de ação tanto da desordem, quanto da resposta ao tratamento (SWANSON *et al.*, 1974).

Taxas aumentadas de TDAH foram encontradas em garotos portadores do alelo de sete repetições do receptor D4 quando comparados aos demais polimorfismos. Receptores D4 são usualmente encontrados em interneurônios gabaérgicos e parecem inibir a transmissão gabaérgica excessiva, que seria prejudicial à memória. O alelo de 7 repetições representa uma forma menos eficiente do receptor, incapaz de inibir apropriadamente a transmissão gabaérgica (WANG *et al.*, 2002; ARNSTEN, 2005). A ocorrência do alelo 7R em garotos também correlacionou-se à persistência da doença. Uma associação semelhante, no entanto, não foi encontradas em meninas com o mesmo alelo (EL-FADDAGH *et al.*, 2004). A significância do alelo 7R foi sugerida em estudo que mostrou que crianças portadoras do DRD4 de 7 repetições necessitam de doses maiores de metilfenidato para o tratamento dos sintomas, evidenciando que o polimorfismo também correlaciona-se com resposta ao tratamento (HAMARMAN *et al.*, 2004).

Em adição a isso, o receptor D5 e transportadores de serotonina também demonstraram estar envolvidos na gênese do TDAH (BOBB *et al.*, 2005). Alguns trabalhos mostram que a desordem está associada ao alelo 5HTR1B 816G (HAWI *et al.*, 2002), enquanto outros sugerem envolvimento do alelo longo de transportador de serotonina na gênese do transtorno (RETZ *et al.*, 2002). Agonistas seletivos em receptores serotoninérgicos, como o 5-HT2A, parecem diminuir a hiperatividade locomotora em ratos (O'NEILL, HERON-MAXWELL e SHAW, 1999).

Dados contraditórios a respeito do sistema de degradação enzimática da catecol-O-metiltransferase (COMT) no que diz respeito ao TDAH existem na literatura. A COMT cataliza a degradação de catecolaminas, especialmente dopamina (WEINSHILBOUM *et al.*, 1999). O polimorfismo da COMT influencia sua ação catalítica, por exemplo, substituição da variante valina por metionina no codon 108 ou 158 diminui a atividade enzimática em três a quatro vezes (LACHMAN *et al.*, 1996). Os efeitos do polimorfismo na COMT e sua associação com TDAH têm sido confirmados por alguns estudos (BELGROVE *et al.*, 2005), mas rejeitados por outros (TAERK *et al.*, 2004).

Estudos de neuroimagem funcional em adultos com TDAH demonstraram que existe uma hipoatividade frontal (LEVY *et al.*, 2001). Estudos de ressonância magnética encontraram diminuição do volume no córtex pré-frontal (CASTELANOS *et al.*, 1996; HILL *et al.*, 2003), corpo caloso (FILIPEK *et al.*, 1997) e assimetria anormal e menor volume do núcleo caudado (CASTELANOS *et al.*, 1996b; FILIPEK *et al.*, 1997). Estudos utilizando SPECT encontraram uma disponibilidade aumentada do transportador de dopamina, que é revertida pela administração de metilfenidato, em adultos portadores de TDAH (KRAUSE *et al.*, 2000).

1.3 Fatores ambientais e déficit de atenção

Sabe-se que o tabagismo durante a gravidez prediz TDAH. Numerosos estudos encontraram uma associação significativa entre exposição pré-natal ambiental ao tabaco e TDAH ou comportamentos relacionados ao TDAH, até após feito o controle para exposição pós-natal e psicopatologia familiar (KOTIMAA *et al.*, 2003). Em estudos de caso-controle, investigadores chegaram à taxas de risco 2 a 4 vezes maior para TDAH associado com a exposição pré-natal ao tabaco (MICK *et al.*, 2002; MILBERGER *et al.*, 1998). Os receptores nicotínicos também foram implicados na gênese do transtorno e é sabido que este sistema contribui para a mediação da atenção (ADLER *et al.*, 1998). Soma-se a isso o fato de que a nicotina estimula a liberação de dopamina, uma ação psicoestimulante da droga (KRAUSE *et al.*, 2002). Alternativamente, o tratamento de adultos portadores de déficit de atenção com o agonista nicotínico ABT-418 aliviou significativamente a severidade dos sintomas nesses pacientes (WILENS *et al.*, 1999). Finalmente, existe uma marcante associação entre

portadores de déficit de atenção e tabagismo quando comparados à população geral (POMERLAU *et al.*, 1995).

A exposição pré-natal ao álcool está associada a uma série de alterações no cérebro e no desenvolvimento comportamental. Crianças expostas ao álcool no período pré-natal podem apresentar hiperatividade, disfunção motora, problemas de linguagem e déficits de aprendizado (MATTSON e RILEY, 1998; STREISSGUTH, 1986). O abuso crônico de álcool durante a gravidez é associado a importantes efeitos teratogênicos na prole (ABEL, 1981; ERNHART *et al.*, 1987) e o álcool é uma das causas líderes de retardo mental e malformações congênitas em humanos. No entanto, a extensão e severidade dos déficits dependem de muitos fatores como: a quantidade consumida, a frequência com que se consome e o período da gravidez (MATTSON *et al.*, 2001). Estes déficits foram agrupados num conjunto de sintomas que define a chamada Síndrome Fetal Alcoólica. Trata-se na verdade, de um espectro que vai desde leves alterações comportamentais a retardo de crescimento, microcefalia, anormalidades faciais, incoordenação motora e, em casos mais graves, malformações cardíacas e retardo mental (ARCHIBALD *et al.*, 2001).

O etanol rapidamente atravessa a barreira placentária e atinge concentrações no feto semelhantes àsquelas do sangue materno. As conseqüências do alcoolismo no segundo e terceiro trimestres da gravidez não são bem definidas, mas estudos animais sugerem que o cérebro é vulnerável ao etanol em todo o seu período de desenvolvimento (MATTSON *et al.*, 2001). Estudos de neuroimagem identificaram alterações estruturais em várias regiões cerebrais incluindo os gânglios da base, corpo caloso, cerebelo e hipocampo que parecem contribuir para os déficits cognitivos (MATTSON *et al.*, 2001). Além disso, o crescimento cerebral continua a ser negativamente afetado mesmo longo tempo após o insulto pré-natal e as regiões do cérebro mais afetadas parecem ser consistentes com os déficits neuroquímicos característicos de crianças expostas ao álcool no período pré-natal (RILEY *et al.*, 2004).

Evidências experimentais demonstram que o álcool interfere com diversos mecanismos moleculares, neuroquímicos e eventos celulares que ocorrem durante o desenvolvimento cerebral normal. A disfunção de diversos sistemas e seus receptores, bem como mudanças no sistema endócrino, também são importantes fatores envolvidos nas

alterações do neurodesenvolvimento observadas in útero após a exposição ao etanol (GUERRI, 2002).

Demonstrou-se que o etanol afeta um extenso número de proteínas de membrana que participam na transmissão de sinais, incluindo receptores de neurotransmissores aminérgicos e opióides, enzimas tais como Na⁺/K⁺ ATPase, adenilato-ciclase, fosfolipase C e canais iônicos (DIAMOND e GORDON, 1997). A exposição pré-natal ao álcool leva a anormalidades na função do sistema dopaminérgico no mesencéfalo. Por exemplo, há uma redução na captação de dopamina e na ligação aos sítios receptores, na quantidade de dopamina nas áreas somatodendríticas e terminais (RATHBUN e DRUSE, 1985) em animais. Pode haver também mudança na morfologia dos neurônios dopaminérgicos, isto é, corpos celulares menores e retardo no crescimento dendrítico (SHETTY *et al.*, 1993), além de mudanças na função do receptor de dopamina (SHEN *et al.*, 1995; WANG e SHEN, 2002) e do comportamento mediado pelo receptor de dopamina (HANNIGAN e RANDAL, 1995).

Estudos eletrofisiológicos mostram que, após a exposição pré-natal ao etanol, ocorre uma redução persistente da atividade elétrica de neurônios dopaminérgicos, com conseqüente diminuição da quantidade de dopamina, sem que haja, no entanto, perda neuronal (XU e SHEN, 2001). Dada a conexão entre transmissão dopaminérgica anormal e problemas de atenção, a redução na atividade elétrica de neurônios dopaminérgicos explicaria os déficits de atenção observados em crianças com síndrome fetal alcoólica - SFA (STREISSGUTH *et al.*, 1994; COLES *et al.*, 1997).

1.4 Vias centrais envolvidas com o TDAH

No sistema nervoso central, monoaminas como Dopamina (DA), Serotonina (5-HT) e Noradrenalina (NA) têm um importante papel modulatório na neurotransmissão e estão envolvidas em inúmeras funções fisiológicas e condições patológicas (GREENGARD, 2001; GAINTDINOV *et al.*, 2002).

Dopamina

A catecolamina dopamina parece ter um papel fundamental na etiologia do déficit de atenção. Isto se baseia na neurofarmacologia dos psicoestimulantes utilizados no tratamento, em estudos de genética molecular e neuroimagem, além do comportamento e bioquímica de modelos animais (KYRLEY *et al.*, 2002).

Ao contrário de neurotransmissores excitatórios, como o Glutamato, ou inibitórios, como o ácido γ -amino-butírico (GABA), a Dopamina pode ser excitatória ou inibitória, dependendo do tipo de receptor a que está ligada (NEVE e NEVE, 1997). A ativação dos receptores D1 e D5 estimula a Adenilato-Ciclase, enquanto sua ligação a receptores D2, D3 e D4 provoca inibição da Adenilato-Ciclase. A noradrenalina também age em receptores dopaminérgicos, possuindo alta afinidade por D4 (ARNSTEN, 2005). A interpretação das mudanças dopaminérgicas na patologia do TDAH é, assim, complicada por seu perfil de ação dual, excitatório e inibitório (VAN DER KOOJI e GLENNON, 2007).

O TDAH resulta, em parte, de déficits no sistema Dopaminérgico em estruturas corticais, como o córtex pré-frontal (SULLIVAN e BRAKE, 2003) e áreas subcorticais, como o Núcleo Accumbens (Nac) e o estriado (RUSSEL *et al.*, 1995).

Existem quatro grandes vias dopaminérgicas no cérebro: mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e hipotálamo-túbero infundibular. A via mesolímbica projeta-se da área ventral-tegmental (VTA) para o núcleo accumbens e está envolvida na dependência a substâncias, recompensa (CALLAHAN *et al.*, 1997), depressão (causada pela depleção de dopamina) (KLIMEK *et al.*, 2002) e psicose (WATANABE *et al.*, 1998). A via mesocortical projeta-se da VTA para o córtex cerebral, notadamente córtex pré-frontal (PFC), e regula o processamento de informações, atenção seletiva, memória de trabalho (habilidade de reter informações na memória e utilizá-las para guiar ações futuras), linguagem e planejamento (GOLDMAN-RAKIE, 1996). O sistema nigro-estriatal inicia-se na substância nigra pars compacta (SNc) e regula funções motoras, dentre outras (MALER *et al.*, 1973). A via hipotálamo-tubero infundibular origina-se no núcleo arqueado do hipotálamo e projeta-se primariamente para a hipófise, regulando a secreção de prolactina e hormônio luteinizante (LH) (WIESEL *et al.*, 1978).

As vias mesolímbica e mesocortical (juntas chamadas de via mesolímbocortical) parecem ser as mais envolvidas na gênese do déficit de atenção (SULLIVAN e BRAKE, 2003). A dopamina mesolímbica parece estar desregulada nos portadores do transtorno, uma vez que recompensas menores e imediatas são preferidas quando comparadas a maiores, mas tardias (SONUGA-BARKE *et al.*, 1992). Esta “impaciência maladaptativa” para esperar por recompensas maiores é um dos aspectos da impulsividade observados no transtorno e parece ser controlada pelo NAc (CARDINAL *et al.*, 2004). A dopamina mesocortical está ainda envolvida na atenção seletiva e memória de trabalho e este sistema parece hipofuncionante em modelos animais de déficit de atenção (DAVIDS *et al.*, 2002).

A via nigro-estriatal também parece contribuir para a gênese do TDAH no que se refere à hiperatividade. Demonstrou-se que o transportador de dopamina (DAT), um regulador importante da neurotransmissão dopaminérgica, encontra-se diminuído em resposta à administração do metilfenidato (MPH) a pacientes portadores de TDAH (KRAUSE *et al.*, 2000).

Noradrenalina

A Noradrenalina é encontrada no Sistema Nervoso Simpático e biossintetizada a partir do aminoácido tirosina, que é seqüencialmente hidrolizada para gerar dihidroxifenilalanina (Dopa), descarboxilada para formar Dopamina (DA) e hidroxilada para produzir Noradrenalina (NA) (AXELROD, 1974). Alterações na enzima dopamina β -hidroxilase, responsável pela etapa final da conversão de dopamina em noradrenalina, foram descritas em portadores de TDAH (VAN TOL *et al.*, 1991). Um dos mensageiros neuroquímicos cruciais no sistema nervoso central, NA tem um papel importante na fisiologia e patologia humana, estando envolvida na regulação do sono, humor, comportamento e estado de alerta e vigília (YOUNG e LANDSBERG, 1998). A catecolamina também exerce controle central no sistema endócrino e sistema autonômico central. Fora do sistema nervoso central, NA também é encontrada nas terminações nervosas simpáticas e a quantidade de noradrenalina presente em determinado tecido reflete seu grau de inervação simpática (TELLIOGLU e ROBERTSON, 2001).

No córtex pré-frontal (PFC), a noradrenalina estimula a performance cognitiva através de suas ações em receptores adrenérgicos $\alpha 2A$ (ARNSTEN *et al.*, 1996). Estudos experimentais sugerem que níveis adequados de noradrenalina (e dopamina) são necessários para o ótimo funcionamento do cortex pré-frontal (PFC), que níveis muito altos destas catecolaminas (como os observados em situações de estresse) podem causar prejuízos no funcionamento do PFC através de sua ação em receptores adrenérgicos $\alpha 1$ e $\beta 1$ e dopaminérgicos D1 e, possivelmente, D4 (ARNSTEN e LI, 2005); e que estas alterações podem ser, em parte, revertidas pela administração de agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos como clonidina e guanfacina (BIEDERMAN e SPENCER, 1999).

O transportador de Noradrenalina (NAT) localiza-se na membrana plasmática de neurônios noradrenérgicos, onde é responsável pela recaptção de noradrenalina presente na fenda sináptica. O NAT serve como mecanismo primário de inativação da transmissão noradrenérgica. Este é um processo competitivo, onde uma variedade de aminas naturais (como dopamina) e outras drogas podem ocupar o transportador e influenciar na captação do neurotransmissor. Drogas de abuso como cocaína e antidepressivos como desipramina, venlafaxina, bupropiona e reboxetina bloqueiam o transporte, causando assim uma elevação nas concentrações sinápticas de noradrenalina e potenciação da ativação de receptores pós-sinápticos (TELLIOGLU e ROBERTSON, 2001; TRENDELEMBURG, 1991; AMARA e SONDEERS, 1998).

O papel da noradrenalina na fisiopatologia do Déficit de Atenção há tempos vem sendo proposto. KORNETSKY (1970), após observar os efeitos das anfetaminas no comportamento, propôs que a hiperatividade no TDAH seria resultante de transmissão noradrenérgica aumentada. Consistentes com esta hipótese, uma década após, ZAMETKIN e RAPOPORT (1987) propuseram que o TDAH parece estar associado com déficits em conexões inibitórias fronto-estriatais, que são predominantemente compostas de neurônios noradrenérgicos, e atuam sobre estruturas estriatais baixas que são predominantemente compostas de neurônios dopaminérgicos. Pliska *et al.* (1996) também sugerem que a rede noradrenérgica central parece estar desregulada em portadores de TDAH de maneira a não preparar o sistema de atenção posterior cortical para responder a estímulos externos. A eficácia de drogas de ação noradrenérgica seletiva corrobora esta hipótese. Solanto (1998), revisando estudos pré-clínicos e clínicos, observou que o efeito noradrenérgico de

psicoestimulantes parece ser o mecanismo pelo qual estas drogas melhoram a resposta tardia, memória de trabalho e atenção. Atenção e vigília dependem, sabidamente, da adequada modulação de catecolaminas nos córtex pré-frontal, cíngulo e parietal, no tálamo, estriado e hipocampo. Todas essas são sabidamente regiões de extensa distribuição de neurônios noradrenérgicos (BIEDERMAN *et al.*, 1999).

Baixas doses de Metilfenidato e anfetamina sabidamente aumentam níveis de dopamina e noradrenalina no córtex pré-frontal de ratos, tendo apenas um pequeno efeito no estriado (BERRIDGE e STALNAKER, 2002). Existem relativamente baixos níveis de transportador de dopamina (DAT) no córtex pré-frontal (PFC), assim, o aumento tanto nos níveis de noradrenalina quanto de dopamina parece ocorrer através do bloqueio de transportadores de noradrenalina (NAT), que são responsáveis pela recaptção das duas catecolaminas nesta região (BYMASTER *et al.*, 2002).

Serotonina

Alguns estudos, como o de Retz *et al.* (2000), têm implicado também serotonina (5HT) na etiologia do déficit de atenção. A desordem é associada com o alelo 5HTR1B 861G (HAWI *et al.*, 2002) e com o alelo longo 5HTT (RETZ *et al.*, 2002). Demonstrou-se anteriormente que receptores 5HT modulam a função dopaminérgica. Assim, a eficácia clínica de drogas que agem em sistemas serotoninérgicos se deveria em parte aos seus efeitos em sistemas dopaminérgicos (ALEX e PEHEC, 2007). A natureza e direção desta interação, no entanto, dependeria da atividade basal dos sistemas de DA e 5HT, ou seja, se estes sistemas estariam ativados ou não (ALEX e PEHEC, 2007). Os corpos celulares e regiões terminais das três principais vias dopaminérgicas são inervados por neurônios 5HT originados nos núcleos da raphe (NEDEGAARD *et al.*, 1988) e estudos mostram a existência de contatos sinápticos diretos entre terminais serotoninérgicos e células dopaminérgicas no mesencéfalo. Estes dados mostram que a serotonina parece regular a função de neurônios dopaminérgicos em regiões cerebrais, estando assim envolvida na patogênese do déficit de atenção.

Glutamato

Os receptores glutamatérgicos NMDA parecem ter um papel na fisiopatologia do distúrbio. Quando estimulados pelo ácido glutâmico, desempenham funções tróficas no desenvolvimento cerebral, influenciando a plasticidade sináptica, promovendo proliferação e migração de progenitores neuronais (IKONOMIDOU *et al.*, 2001). Demonstrou-se recentemente que um bloqueio transitório dos receptores de glutamato NMDA ou a ativação excessiva de receptores GABA no período de neurodesenvolvimento ou sinaptogênese desencadeia neurodegeneração apoptótica (OLNEY *et al.*, 2000; IKONOMIDOU *et al.*, 2001), ainda que a administração neonatal de ketamina, antagonista de receptores NMDA, provoque déficits de memória espacial, memória aversiva e memória de reconhecimento em ratos (MICKLEY *et al.*, 2000). A ketamina é implicada na interação de receptores NMDA e dopaminérgicos, principalmente no córtex pré-frontal (MOGHADDAM *et al.*, 1997). Olney *et al.* (2000) demonstraram que o etanol, através de ação dual no bloqueio de receptores NMDA e super ativação de receptores GABA_A, desencadeia extensa degeneração apoptótica no cérebro de ratos em desenvolvimento.

1.5 Neurobiologia do TDAH

Diferentes áreas cerebrais parecem estar afetadas em portadores de TDAH. Sintomas de desatenção seletiva estariam ligados ao processamento de informação ineficiente no córtex cingulado anterior (na parte medial do lobo frontal), responsável pela execução de tarefas cognitivas complexas, detecção de alvos, seleção de respostas e inibição, detecção de erros, monitoramento de performance e motivação (BUSH *et al.*, 2000); sintomas de disfunção executiva, particularmente a incapacidade de manter a atenção e solucionar problemas, manutenção da vigília, atenção seletiva e dividida, atenção alternada, planejamento e controle executivo estão hipoteticamente ligados ao córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) (DUNCAN e OWEN, 2002; POSNER e PETERSEN, 1990). Cada área do córtex pré-frontal está ligada a outras áreas cerebrais via circuitos corticais que conectam uma área a outra dentro do próprio córtex e via circuitos córtico-estriatal-talâmico-corticais (CSTC) que conectam áreas do córtex pré-frontal a estruturas subcorticais (STAHL, 2008).

Os sintomas de hiperatividade estão ligados ao córtex motor suplementar/córtex pré-frontal motor e também ao estriado (núcleos caudado e putâmen) que apresentam volume diminuído (ALEXANDER *et al.*, 1986) e anormalidades nos transportadores de dopamina (SPENCER *et al.*, 2005), enquanto os sintomas de impulsividade e desinibição social estariam ligados ao córtex frontal orbital (HESSILINGER *et al.*, 2002).

O córtex frontal orbital é parte do sistema límbico e está ligado a outra área importante deste sistema, o núcleo accumbens, via circuitos CSTC. Este circuito específico parece ser responsável por ligar um estímulo ascendente a emoções e transformar emoções em ações. Estas ações ocorrem através de liberação do neurotransmissor dopamina. Os estímulos capazes de desencadear tal resposta são usualmente poderosos, carregando o potencial de serem imediatamente transformados em ação, antes que sejam aplicados análise cognitiva, reflexão e julgamento. Esta é a essência da impulsividade, e pode ajudar a entender porque pessoas impulsivas agem de maneira auto-destrutiva e pouco racional (STAHL, 2008).

Aparentemente, todos estes sintomas de impulsividade parecem ser devidos a um filtro de informação talâmico ineficiente no lobo pré-frontal através do circuito CSTC, permitindo que a ação impulsiva ocorra antes que o “governante” do lobo pré-frontal, o DLPFC, possa inibi-la (ZAMETKIN e RAPOPORT, 1987).

Portadores de TDAH apresentam uma ativação diminuída em neurônios pré-frontais. Em resposta a tarefas cognitivas que exijam atenção e memória de trabalho, estes indivíduos não apenas falham em ativar áreas como o córtex cingulado anterior, mas também recrutam áreas que, normalmente, não teriam esta função, resultando em resposta lenta, ineficiente e incorreta (STAHL, 2008). Acredita-se que o tônus de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos esteja disfuncional em portadores do distúrbio (ARNSTEN e DUDLEY, 2005). Em consequência disto, neurônios piramidais no córtex pré-frontal não seriam capazes de distinguir entre estímulos importantes e distrações, levando à dificuldade em manter o foco de atenção. Estes déficits são revertidos por agonistas de receptores dopaminérgicos D1 e noradrenérgicos $\alpha 2$ (ARNSTEN e DUDLEY, 2005), que aumentam o tônus “aminérgico” nestes neurônios, diminuindo a interferência de estímulos distrativos. Ao contrário, a ativação excessiva dos circuitos de vigília também pode estar presente no TDAH (ARNSTEN e DUDLEY, 2005). Tão deletária quanto a ativação diminuída, esta parece estar ligada à

presença de estresse crônico e comorbidades como ansiedade, dependência de substâncias e estados de humor excessivamente elevados (mania) (STAHL, 2008).

1.6 Tratamentos do TDAH

Há pelo menos três décadas foi descoberto que os psicoestimulantes, como as Anfetaminas e o Metilfenidato, foram capazes não só de diminuir a hiperatividade e a impulsividade, mas também de melhorar a atenção (FREDRIKSSON *et al.*, 2004). Os estimulantes facilitam a liberação e disponibilidade sináptica de Dopamina (DA) (PLISZKA *et al.*, 1996; FLECKENSTEIN *et al.*, 2000), além de outros neurotransmissores monoaminérgicos, notadamente Noradrenalina (NE) e Serotonina (5-HT) (BIEDERMAN e SPENCER, 1999).

Originalmente, observou-se que o tratamento de crianças com Lesão Cerebral Mínima (LCM, o que hoje é chamado de TDAH) com sedativos paradoxalmente aumentava a atividade e impulsividade. Além do mais, a administração de estimulantes normalizou as mudanças comportamentais vistas nessas crianças (BRADLEY, 1937).

O psicoestimulante Metilfenidato (MFD), cuja estrutura está demonstrada na figura 1, é um derivado da piperidina (GATLEY *et al.*, 1996) e age primariamente na glicoproteína transportadora de Dopamina (DAT). A droga interage e bloqueia o DAT, interferindo ainda com o tráfego de vesículas contendo Dopamina (SANDOVAL *et al.*, 2002; VOLKOW *et al.*, 1998), aumentando sua disponibilidade no terminal pós-sináptico.

Muitos pesquisadores estudaram os efeitos do Metilfenidato em receptores dopaminérgicos e no transportador de dopamina, mas pouco se comenta sobre sua ação em receptores adrenérgicos α_2 e no transportador de noradrenalina (NAT). Estudos bioquímicos mais recentes utilizando baixas doses de Metilfenidato demonstraram um efeito mais potente na concentração de noradrenalina no hipocampo do que propriamente na dopamina estriatal (ARNSTEN e DUDLEY, 2005).

As anfetaminas, não disponíveis para este fim no mercado brasileiro, também são largamente utilizadas para o tratamento do TDAH em países como os Estados Unidos. Agem de maneira menos seletiva, pois além de bloquearem o DAT e aumentarem sua quantidade na

fenda sináptica, liberam também Serotonina, que se utiliza do DAT em certo grau (KUCZENSKI e SEGAL, 1989).

As medicações estimulantes utilizadas no tratamento do TDAH foram, em sua maioria, de ação curta, com meia-vida em torno de 3 a 4 horas, requerendo múltiplas tomadas diárias. Hoje, estão disponíveis em diferentes formulações de liberação prolongada, durando entre 8 e 12 horas (VAN DER KOOJI *et al.*, 2007).

Tanto a Anfetamina quanto o Metilfenidato têm reputação dúbia, uma vez que podem ser utilizados como drogas de abuso pela população saudável (CARTER e WATSON, 1994). Assim, uma demanda de novos tratamentos para o TDAH está aparente. Estima-se que ao menos 30% dos indivíduos portadores de déficit de atenção ou não respondem ou não toleram medicações estimulantes devido aos efeitos adversos.

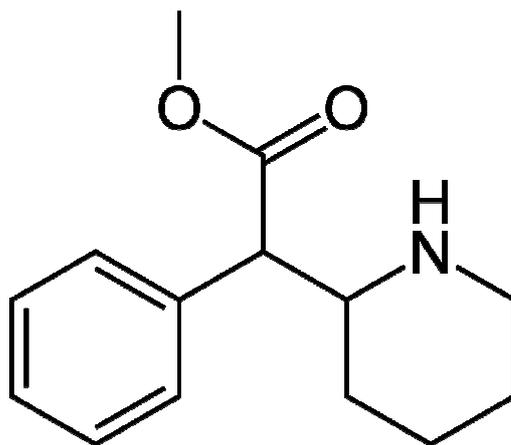


Figura 1 – Estrutura do Metilfenidato.

Outra alternativa para o tratamento do transtorno são os antidepressivos tricíclicos (TCA), como imipramina e desipramina. A primeira, mais seletiva para o transportador de serotonina e a segunda para o de noradrenalina. Vantagens desta classe de drogas incluem longa meia vida de aproximadamente 12 horas, possibilitando um menor número de tomadas, ausência de potencial de abuso e efeitos positivos putativos no humor, ansiedade, sono e tiques (BIEDERMAN e SPENCER, 1999). Acredita-se que o potencial terapêutico dos tricíclicos no tratamento do TDAH vem de suas ações na recaptação de monoaminas (inibindo

este processo), particularmente de noradrenalina (TATSUMI *et al.*, 1997). Os potenciais benefícios dos tricíclicos, no entanto, têm sido apagados por preocupações a cerca de sua segurança. Há estudos demonstrando alterações na condução cardíaca associados ao tratamento com tricíclicos (BIEDERMAN *et al.*, 1993) e relatos de casos de morte súbita em crianças portadoras de TDAH tratadas com desipramina (ABRAMOWICZ, 1991). Devido a estes riscos, os TCA são usualmente utilizados como segunda linha no tratamento, havendo de se pesar cuidadosamente os riscos e benefícios para sua utilização (BIEDERMAN e SPENCER, 1999).

A bupropiona, antidepressivo atípico que possui ação agonista dopaminérgica e noradrenérgica, mostrou-se efetiva em alguns estudos clínicos (CASAT *et al.*, 1987, 1989; CONNERS *et al.*, 1996). Embora tenha sido associada a um risco moderadamente aumentado de convulsões, este risco parece estar relacionado a doses altas, história prévia de convulsões e distúrbios alimentares. Os inibidores da monoamino oxidase (MAO) podem ser efetivos no tratamento do distúrbio, mas o seu potencial para desencadear crises hipertensivas, restrições alimentares (alimentos contendo tiramina, como queijos) e interações medicamentosas (aminas vasoativas, a maioria dos anti-gripais, anfetaminas) limita a sua utilização (BIEDERMAN e SPENCER, 1999).

As medicações não-psicoestimulantes têm ganhado força como possíveis alternativas no tratamento do déficit de atenção. A atomoxetina foi a primeira medicação não-psicoestimulante a ser aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento do TDAH (CHRISTMAN *et al.*, 2004). Anteriormente utilizada como antidepressivo, ela age bloqueando o transportador de Noradrenalina (NAT), inibindo a recaptação da mesma, bem como a de Dopamina em certo grau, já que esta também se utiliza do NAT (BYMASTER *et al.*, 2002). A atomoxetina é uma droga relativamente cara, sendo portanto reservada para casos onde o Metilfenidato é inefetivo ou contra-indicado. Esta medicação, assim como as anfetaminas, não está disponível no Brasil. Na mesma classe dos inibidores seletivos de recaptação de Noradrenalina está a Reboxetina.

1.7 Reboxetina

O antidepressivo Reboxetina (estrutura demonstrada na figura 2) é um inibidor altamente seletivo e potente da recaptação de Noradrenalina comercializado na Europa e América do Sul. A inibição da recaptação e o conseqüente aumento da disponibilidade de noradrenalina na fenda sináptica estão entre os mecanismos de ação mais importantes dos antidepressivos conhecidos. Ao contrário dos antidepressivos tricíclicos, a droga não possui afinidade significativa por receptores adrenérgicos e muscarínicos. A afinidade a estes receptores foi descrita como estando associada a efeitos colaterais cardiovasculares, anticolinérgicos e sedativos. Em doses terapeuticamente eficazes, ela também não apresenta ligação significativa aos receptores de histamina e dopamina. Quando comparada à atomoxetina, a reboxetina apresenta meia-vida mais longa (13h vs. 4h) (TEHRANI-DOOST *et al.*, 2008). As doses utilizadas em humanos variam de 4 a 10mg por dia. Após administração oral de dose única de 4mg de Reboxetina a voluntários saudáveis, alcançou-se pico de concentração plasmática de aproximadamente 130ng/ml. Observaram-se condições de equilíbrio num prazo de cinco dias. Dados indicam que a biodisponibilidade absoluta é de aproximadamente 90%. A droga apresenta alta taxa de ligação à proteínas plasmáticas, com afinidade maior à glipoproteína I-ácida do que à albumina.

Os efeitos adversos relatados são leves a moderados em termos de severidade. A Reboxetina é melhor tolerada em comparação aos tricíclicos e mais segura quando comparada a outros antidepressivos (RATNER *et al.*, 2005). Poucos estudos existem avaliando o uso da Reboxetina no tratamento do TDAH, e a maioria deles mostra um resultado favorável (OTKA *et al.*, 2001; RATNER *et al.*, 2005). Há pelo menos um estudo com modelos animais de déficit de atenção, utilizando ratos SHR e NHE (VIGGIANO *et al.*, 2004). Nenhum deles no entanto, avaliou especificamente a resposta em modelos de déficit de atenção causados por etanol.

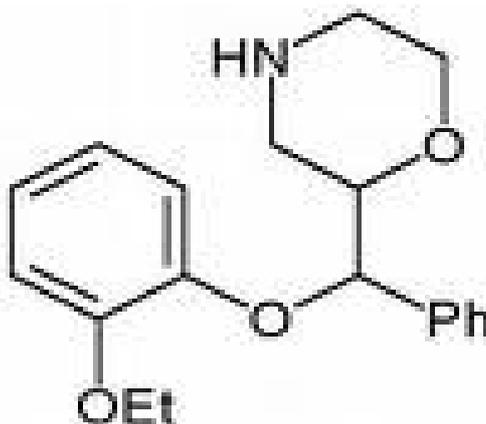


Figura 2 – Estrutura da Reboxetina.

1.8 Modelos para o estudo do déficit de atenção

O diagnóstico do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) baseia-se em critérios comportamentais, de modo que modelos animais do distúrbio devem mimetizar os sintomas-chave de hiperatividade, impulsividade e dificuldades em manter a atenção. Sendo o TDAH um distúrbio heterogêneo, onde frequentemente duas crianças com o mesmo distúrbio têm quadros clínicos diferentes, não é surpresa que diversos modelos animais envolvendo déficits em mecanismos neurais diferentes reproduzam os sintomas do transtorno (RUSSEL, 2007).

Modelos animais têm um número de vantagens sobre casos clínicos: os dados obtidos são mais simples de se interpretar, os grupos são geneticamente mais homogêneos, o ambiente mais controlado e as intervenções possíveis são variadas. A apreciação de modelos animais utilizados na pesquisa sobre o déficit de atenção depende, portanto, de algumas variáveis: capacidade de mimetizar os sintomas fundamentais do TDAH (validade de semelhança), capacidade de confirmar o racional teórico implicado na gênese do transtorno (validade de construção) e habilidade de prever aspectos do comportamento, genética e neurobiologia (validade preditiva) (KOOJI e GLENNON, 2007).

Alguns dos modelos animais de déficit de atenção, utilizam a lesão cerebral por neurotoxinas. A lesão neonatal com 6-OHDA, que após injeção intra-cisternal é tóxica aos

sistemas noradrenérgicos e dopaminérgicos, causando hiperatividade e desatenção que respondem aos psicoestimulantes, é um deles (SHAYWITZ *et al.*, 1976; ARCHER *et al.*, 1988; ZHANG *et al.*, 2001). Outro modelo nesta categoria, o da hipóxia neonatal, causa alterações na dopamina mesocortical, mesolímbica e estriatal (BOKSA e EL-KHODOR, 2003), além de apoptose em células hipocâmpais e alterações nos níveis de glutamato e acetilcolina (KRAJNE *et al.*, 1994), resultando em sintomas de TDAH. Limitações deste modelo incluem o fato de as alterações principais estarem associadas a receptores de dopamina D1 quando a maioria dos estudos realizados sugerem envolvimento dos receptores D4 (DRAGO *et al.*, 1996), além dos animais submetidos à hipóxia apresentarem níveis normais de DAT quando comparados aos controles, o que não acontece em pacientes portadores de déficit de atenção.

Modelos genéticos, como é o caso dos ratos espontaneamente hipertensos (SHR), um dos modelos mais antigos e difundidos do transtorno devido ao seu comportamento naturalmente hiperativo e impulsivo, além da presença de alterações em noradrenalina e dopamina, também são utilizados (VAN DER KOOJI e GLENON, 2007). Estas características no entanto, parecem variar de acordo com o teste comportamental utilizado, o que compromete a validade do modelo (FERGUSON e CADA, 2003). Outra possibilidade é a indução de mutações genéticas, como no rato coloboma, onde há uma mutação interferindo na função da proteína SNAP-25, responsável pela formação de vesículas contendo neurotransmissores, notadamente dopamina e noradrenalina. A mutação causa uma diminuição nos níveis destas catecolaminas (JONES *et al.*, 2001; RABER *et al.*, 1997), levando a comportamento hiperativo (HESS *et al.*, 1996). Ainda nesta categoria, encontra-se o rato nocaute para o gene do transportador de dopamina (DAT-KO), onde há reduzidos níveis de DAT provocando recaptção deficiente de dopamina, acúmulo de dopamina na fenda sináptica e diminuição da liberação do neurotransmissor em regiões como o estriado (GAINETDINOV *et al.*, 1999).

A exposição pré-natal ao etanol afeta principalmente a transmissão dopaminérgica e causa hiperatividade (GIBSON *et al.*, 2000). Ratos expostos ao álcool intra-útero apresentam déficits de atenção que são similares aos observados em crianças portadoras de TDAH e síndrome fetal alcoólica (HAUSKNECHT *et al.*, 2005). Em termos neurobiológicos, parece haver uma redução persistente no número de neurônios

dopaminérgicos espontaneamente ativos na área tegmental ventral no mesencéfalo, que é normalizado por D-anfetamina (XU e SHEN, 2001). O psicoestimulante metilfenidato também parece ser eficaz em normalizar a transmissão dopaminérgica, apesar de ter sido demonstrado que pode, inicialmente, haver aumento na hiperatividade, seguido por diminuição persistente da atividade motora que permanece por mais de trinta dias, segundo encontraram Shen e Choong (2006). Thomas *et al.* (2000) demonstraram que a exposição pré-natal ao etanol causava déficits de memória executiva em tarefa de discriminação visual (*T-Maze*). Os déficits estavam presentes tanto na fase de treinamento (aquisição de discriminação), como na fase de discriminação tardia e foram revertidos pela suplementação neonatal de colina.

Carneiro *et al.* (2005) observaram que a prole de ratos expostos ao álcool no período gestacional apresentava alterações bioquímicas nas redes dopaminérgicas, com diminuição significativa de receptores dopaminérgicos D1 e D2, e colinérgicas, com aumento de receptores muscarínicos, em áreas como o hipocampo e o estriado. Também foi observado que estes animais apresentavam hipoatividade no teste do campo aberto, imobilidade prolongada no teste de nado-forçado e menos ansiedade quando comparados a controles no teste do labirinto em cruz elevado. O estudo hipotetiza ainda que o desequilíbrio entre dopamina e acetilcolina seria responsável por tais achados e que a neurotoxicidade do etanol seria mediada por acetilcolina.

Fredriksson e Archer (2004) demonstraram que o comportamento disfuncional presente no TDAH poderia ser reproduzido em animais quando o etanol era aplicado no período neonatal, equivalente ao terceiro trimestre do desenvolvimento do sistema nervoso central em humanos. Postularam, ainda, que este efeito poderia ser devido não apenas às alterações dopaminérgicas, mas ao antagonismo de receptores NMDA. De acordo com esta hipótese, outros estudos demonstraram que a aplicação de glutamato causa aumento significativo e excessivo na liberação de noradrenalina no córtex pré-frontal de ratos SHR quando comparados a controles, ocasionando déficits de atenção neste modelo (RUSSEL e WIGGINS, 2000). Os animais lesados por etanol no período neonatal apresentaram déficits de performance e aprendizado no labirinto radial de oito entradas e no teste da plataforma submersa, sendo os déficits mais pronunciados nos últimos dias de teste, sugerindo problemas de memória tardia. Ainda, apresentaram inicialmente marcante hipoatividade seguida de

hiperatividade motora. Estes sintomas foram mitigados por anfetamina (FREDRIKSSON e ARCHER, 2004). A resposta ao metilfenidato não foi testada neste estudo.

1.9 Memória e TDAH

O conjunto cognitivo denominado “funções executivas” está associado ao funcionamento do lobo frontal, embora na atividade do córtex frontal (figura 3) estejam incluídas funções não relacionadas com o rendimento executivo e, de forma similar, o funcionamento executivo requeira também estruturas distintas do lobo frontal (DENKLA, 1996; STUSS e LEVINE, 2002).

Já no início da década de setenta, o neurologista russo Luria (1973), observou que o lobo frontal participa diretamente nas etapas mais importantes para a codificação do comportamento humano e regulação dos processos psicológicos. Ele descreveu em seu livro que esta região tem um papel essencial na regulação da atividade, controlando o estado de ativação necessário para o desempenho de tarefas complexas. Seguindo o mesmo modelo hierárquico de funcionamento frontal Stuss mostrou que as funções executivas e de supervisão do lobo frontal constituem o segundo nível de processamento. Seriam as funções encarregadas de sintetizar a informação para organizar a resposta dirigida a um objetivo e dependem anatomicamente do estabelecimento de conexões entre o lobo frontal e áreas cerebrais posteriores (ROMINE e REYNOLDS, 2004).

Não parece haver um padrão de desenvolvimento homogêneo para as funções executivas, mas sabe-se que há um incremento significativo na habilidade de memória de reconhecimento na infância, permitindo a formação de conceitos atenção seletiva e ações de planejamento rudimentar (ROMINE e REYNOLDS, 2004), progredindo para processos mais complexos, como inibição de respostas prematuras e flexibilidade cognitiva, que atinge nível de maturação adulto por volta dos 10 a 12 anos de idade em humanos (PASSLER *et al.*, 1985; WELSH, 2002).

Em humanos, memória de trabalho é definida como a manutenção consciente e manipulação de informação necessária para permitir respostas cognitivas e motoras apropriadas a demandas específicas em situações imediatas (BADDELEY, 1981;

EICHENBAUM e COHEN, 2001). Consistente com seu papel nas funções executivas, estudos em humanos e outros primatas demonstraram que o córtex pré-frontal tem um papel essencial na memória de trabalho (EICHENBAUM e COHEN, 2001; PENNINGTON, 1999). Como itens retidos na memória de trabalho são passos intermediários evocados durante a solução de um problema específico, eles tipicamente não são armazenados junto às memórias de longo prazo.

Embora não seja possível evocar ações sabidamente conscientes e planejadas em animais, parece haver processos tanto em primatas quanto em roedores que são análogos a alguns aspectos da memória de trabalho em humanos (DUDCHENKO, 2004). WEYANDT *et al.* (1994) definiram memória de trabalho em roedores como sendo uma memória de curto-prazo para um objeto, estímulo ou localização utilizada durante uma sessão de testes, mas não entre sessões. Em contraste, a memória de referência, que representa aspectos de memória de longa duração, a memória de trabalho é de curta duração, evocada após curtos intervalos e não necessariamente armazenada juntamente com memórias de longa duração. Assim, tarefas que utilizam curtos intervalos “entre treinos”, como as de atenção alternada, avaliam memória de trabalho.

Um dos testes comportamentais utilizados para este fim é o labirinto em forma de T (*T-maze*). Nesta modalidade, o animal é forçado a escolher um dos braços do labirinto e a recompensa é alternada entre os dois braços, havendo um curto intervalo entre os “treinos”. Se o animal é capaz de executar a tarefa corretamente após um curto intervalo de tempo, ele não só é capaz de memorizar a localização da recompensa no “treino” anterior, como aprender a regra de alternância entre os braços e inibir respostas prematuras entrando no braço previamente recompensado (ROBERTSON, 2008). Se a performance do animal deteriorar quando o intervalo entre as sessões de teste aumenta, isto também sugere déficits de memória de trabalho. Estudos prévios, como o de Winocur (1992), mostram que os danos ao córtex pré-frontal resultam em déficits em tarefas de discriminação tardia, como o labirinto em T, que são evidentes tanto em curtos intervalos quanto em intervalos mais prolongados.

Neuropsicologicamente, o rendimento cognitivo deficiente no TDAH é subsidiário a um déficit primário das funções executivas (ARNSTEN *et al.*, 1996; WILLCUTT *et al.*, 2005) e se relaciona com as alterações presentes nos sistemas

dopaminérgico e noradrenérgico em circuitos fronto-estriatais. Especificamente, portadores de TDAH apresentam dificuldades no planejamento (PENNINGTON *et al.*, 1993; WYANDT e WILLIS, 1994), inibição de respostas prematuras (SERGEANT *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2006), flexibilidade cognitiva (SMITH *et al.*, 2006; SEIDMAN *et al.*, 2000), fluidez verbal (SERGEANT *et al.*, 2002) e memória de trabalho (BARKLEY, 2006; SEIDMAN *et al.*, 2000), dentre outras.

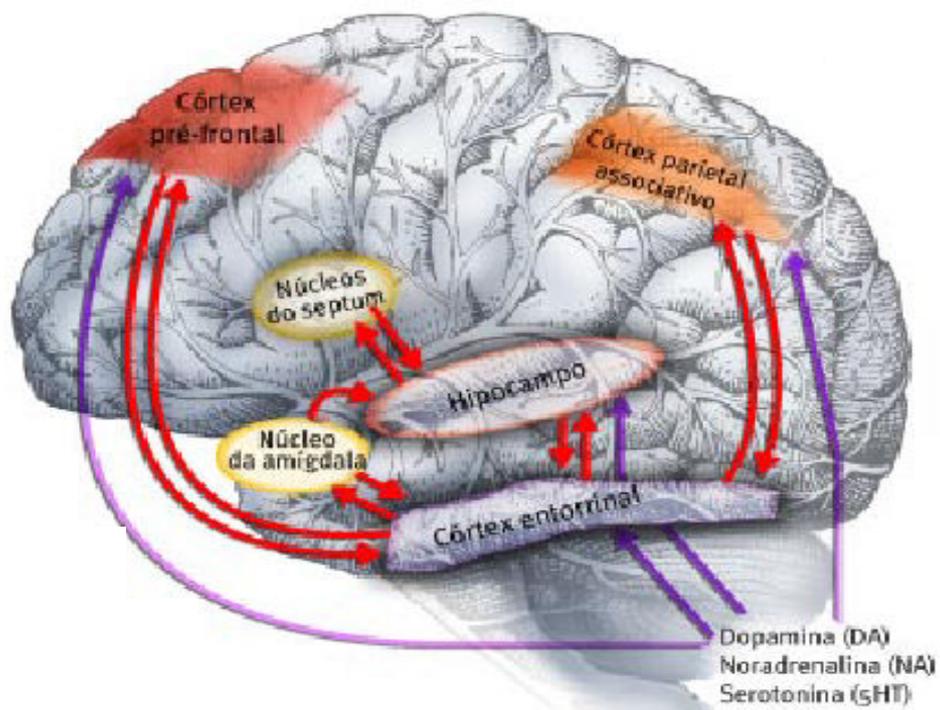


Figura 3 – Principais áreas envolvidas na formação de memórias declarativas de curta e de longa duração, e suas principais conexões (linhas vermelhas mostram a interconexão entre as áreas cerebrais, e as demais linhas mostram a ação dos neurotransmissores sobre as mesmas áreas cerebrais).

Fonte: Revista Ciência Hoje. Abril-1999.

2 JUSTIFICATIVA

A multifatorialidade do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade, ou seja, fatores relacionados com predisposição genética, ambiente e exposição a toxinas no período gestacional, exercem um importante papel em sua patogenia. A fisiopatologia do transtorno, no entanto, permanece com algumas lacunas a serem elucidadas. A resposta a estes fatores estressores produz um comportamento disfuncional, trazendo repercussões em todas as esferas da vida do indivíduo de maneira pervasiva, uma vez que crianças podem permanecer com o transtorno na vida adulta em até pelo menos 50% dos casos. Além disso, o distúrbio pode favorecer o surgimento de comportamentos de risco, como o uso e abuso de álcool e substâncias psicoativas. O tratamento farmacológico com psicoestimulantes, largamente utilizado há mais de três décadas, também traz em si, embora diminuto, o risco de ser utilizado como droga de abuso. Assim, torna-se necessário o conhecimento detalhado da fisiopatologia, bem como o estudo de novas opções farmacológicas não-psicoestimulantes, a fim de otimizar os benefícios e reduzir os riscos da terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos do Metilfenidato e da Reboxetina em modelo experimental de déficit de atenção induzido em camundongos pela lesão por etanol.

3.2 Específicos

Avaliar os efeitos comportamentais do Metilfenidato e da Reboxetina como inibidores do déficit de atenção no modelo experimental de déficit de atenção induzido em camundongos pela lesão por etanol, analisando os seguintes aspectos.

- Atividade locomotora
- Estado depressivo
- Estado de ansiedade
- Memória aversiva e de trabalho

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados aproximadamente 120 camundongos machos e fêmeas Swiss. Os camundongos pesavam 5-7g no 10º dia pós-natal (PND 10) e 17-21g no 30º dia pós-natal (PND 30). Os animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici - Universidade Federal do Ceará (UFC) e transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, UFC. Os animais foram mantidos à temperatura de 25°C com um ciclo de 12 h de luz/escuro.

Os animais permaneceram acondicionados em caixas de plástico forradas com raspa de madeira e receberam água e ração *ad libitum*. Os camundongos foram mantidos em jejum 12 horas antes do teste do *T-maze*, com livre acesso à água mas receberam ração e água *ad libitum* antes dos demais testes comportamentais. O tratamento dispensado aos animais estava de acordo com o "Guia de Cuidados em Uso de Animais de Laboratório" do National Institutes of Health (Bethesda, MD, EUA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo número: 076/2007)

4.2 Drogas

Metilfenidato-Ritalina (Novartis): comprimidos de 10mg.

Reboxetina-Prolift (Pfizer): comprimidos de 4mg.

Álcool Etilico Absoluto P.A. (VETEC).

Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina 0,9%.

4.3 Grupos experimentais

Grupos	
1	Grupo-controle - submetido a injeção de solução salina subcutânea no dia PND 10
2	Grupo-metilfenidato - dose de 2,5mg/kg, <i>v.o.</i>
3	Grupo-reboxetina - dose de 10mg/kg, <i>v.o.</i>
4	Grupo-lesão por etanol - dose 5g/kg (2 x 2,5mg/kg) injeção subcutânea no PND 10
5	Grupo-lesão por etanol - dose 5g/kg injeção subcutânea no PND 10 + metilfenidato – dose 2,5mg/kg, <i>v.o.</i>
6	Grupo-lesão por etanol - dose 5g/kg injeção subcutânea no PND 10 + reboxetina 10mg/kg, <i>v.o.</i>

4.4 Modelo de déficit de atenção induzido pela lesão por etanol

Os animais adultos foram acasalados e, após verificar-se que a fêmea estava grávida, por meio de observação diária determinou-se o dia de nascimento da prole. A prole foi mantida junto à mãe até o período do desmame. No PND 10 os animais foram submetidos a injeção subcutânea de etanol, diluído em solução salina 0,9% na dose de 5mg/kg de peso divididos em duas únicas doses em intervalo de 6 horas. O grupo controle foi submetido a injeção subcutânea de solução salina em volume equivalente ao utilizado no grupo do etanol. A aplicação será feita dentro das duas primeiras semanas de nascimento (dia pós-natal 10), equivalente ao desenvolvimento final (terceiro trimestre) do sistema nervoso central em camundongos. O modelo de lesão neonatal por etanol é o mesmo padronizado por Fredriksson e Archer, 2004.

4.5 Tratamento

No PND 30, foram iniciados os testes de comportamento. Os animais foram divididos em grupos e o tratamento com Reboxetina ou Metilfenidato foi administrado por gavagem 30 minutos antes de cada sessão de testes. Os comprimidos de Metilfenidato e Reboxetina foram macerados e dissolvidos em água destilada. Os animais do grupo controle

receberam volume equivalente de solução salina 0,9% por gavagem. As doses de Metilfenidato foram escolhidas com base em trabalhos anteriores que demonstraram que a resposta aos psicoestimulantes seguem um padrão de U-invertido, onde doses baixas são ineficazes e doses muito altas induzem erros perseverativos (ARNSTEN, 2005). A dose de Reboxetina utilizada em estudos animais varia igualmente, sendo aqui a dose adotada de 10mg/kg de peso.

4.6 Testes comportamentais

4.6.1 Ansiedade - Teste “*plus maze*”

Este teste para estudos de memória foi validado por Viana *et al.* (1994). Foi utilizado o modelo de labirinto em cruz elevado mostrado na figura 4 (LCE), que consiste em dois braços abertos opostos (48x48x12) e dois fechados (48x48x12), também opostos, em forma de cruz. Os braços abertos e fechados foram conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados foram confeccionados em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O aparelho foi elevado a uma altura de 50 cm do nível do solo e localizado em uma sala com luz vermelha (15W). Os animais foram colocados individualmente no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por cinco (5) minutos. O aparelho foi limpo após o teste de cada animal, com solução de etanol a 10% .

A percentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos em relação ao somatório do tempo de permanência nos braços abertos e fechados foi calculada e o quociente obtido foi multiplicado por 100. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços fechados revela um efeito ansiolítico (PELLOW *et al.*, 1985). O Diazepam, na dose de 1mg/kg via *i.p.*, foi utilizado como droga padrão, a fim de se verificar a confiabilidade do teste.



Figura 4 – Labirinto em cruz elevado (“*Plus-Maze*”)

4.6.2 Depressão - Modelo experimental nado forçado

O teste do nado forçado (PORSOLT *et al.*, 1978) avalia um possível efeito antidepressivo de uma substância. O experimento incluiu duas exposições a um tanque de água, espaçadas de 24 horas. Para o experimento, foram utilizados tanques de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura. Deve-se colocar água fresca a 25°C até a metade do tanque, cerca de 20 cm. Durante a primeira exposição, os animais, não tratados, são colocados no tanque, um por vez, e deixados por 15 minutos. Durante a segunda exposição (teste propriamente dito) os animais devem ser tratados e colocados no tanque onde o tempo de imobilidade deve ser contado durante cinco minutos. O animal deve ser considerado imóvel quando permanece flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água. Os antidepressivos devem reduzir o tempo de imobilidade apresentado pelos animais.

4.6.3 Memória Aversiva - Esquiva passiva (*Passive avoidance test*)

Este teste é baseado no método de DeNOBLE e cols. (1986) e está demonstrado na figura 5. No trigésimo dia de vida, os animais foram habituados ao aparelho de esquiva passiva. O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48x22x22), dividida em dois compartimentos separados por uma janela, um branco (iluminado) e um preto (escuro), este tem o piso eletrificado. O animal foi deixado para ambientação no aparelho durante um (01) minuto, e retirado. Após 30 segundos colocado no compartimento iluminado, este ao entrar no compartimento escuro, recebeu um choque de 1,0mA, durante 1s, com o tempo de latência para entrar sendo registrado, até um máximo de 300 segundos (treino). O animal foi retirado e após 15 minutos o mesmo foi colocado novamente no compartimento claro e foi repetido o procedimento (avaliação da memória recente). A retenção do aprendizado foi testada após 24h, da mesma maneira descrita para a memória recente.



Figura 5 – Aparelho de Esquiva Passiva.

4.6.4 Avaliação da atividade locomotora (teste do Campo Aberto)

Neste teste foi possível avaliar a atividade exploratória do animal. Foi usado o modelo do Campo Aberto (BROADHURST, 1957). O campo aberto consiste de uma arena quadrada (50 x 50 cm), iluminada com luz vermelha. O piso da arena é dividido em 4 quadrados iguais, conforme mostrado na figura 6. No teste o animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por um (01) minuto, após este período foi registrado o número de quadrantes atravessados pelo animal (*crossings*), durante um tempo de três (03) minutos e o número de *rearings* (levantar as patas - exploração vertical). A arena foi higienizada com álcool a 20% após cada animal ser retirado, para evitar que o cheiro de urina e fezes interfira no teste.

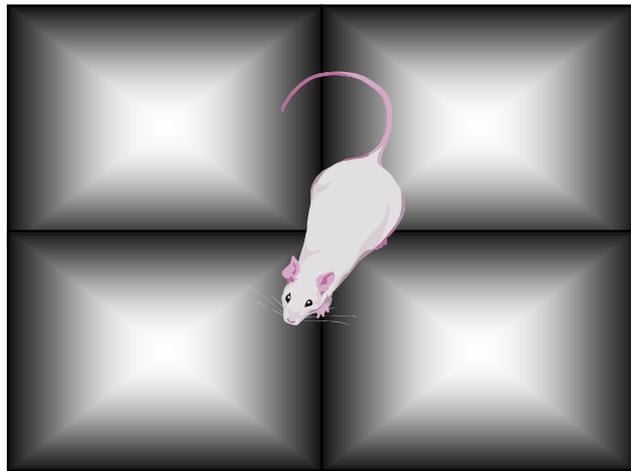


Figura 6 – Arena do Campo Aberto

4.6.5 Avaliação da atividade e performance motora e ansiedade (Caixa Claro-Escuro)

O teste empregado consiste em colocar o animal na parte clara de uma caixa com dois lados (claro e escuro) onde são registrados os seguintes parâmetros: o tempo despendido em cada seção da caixa e número de transições entre as duas áreas da caixa por um período de cinco minutos. O método utilizado foi aquele demonstrado por Soubrié *et al.*, 1975.

4.6.6 Avaliação da memória de trabalho imediata - Teste do *Y-Maze*

Esse teste avalia a memória e o aprendizado. O animal deve alternar espontaneamente quando colocado num labirinto em forma de Y por 5 minutos. Cada braço do Y mede 22 x 7 cm. Todas as entradas em cada braço foram sequencialmente anotadas, assim o número total de entradas em cada braço, bem como a seqüência de entradas é registrada. As informações foram analisadas para determinar o número de entrada do braço sem repetição. O sucesso do teste é indicado pelo número de seqüências corretas sem repetição, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último (Stone *et al.*, 1991). Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel.

4.6.7 Avaliação da atenção e memória - Teste do *T-Maze*

O método utilizado foi aquele demonstrado por Thomas *et al.*, 2004. O teste utiliza um labirinto em forma de T com portas de guilhotina isolando a “*startbox*” e as “*goalboxes*” da passarela. Duas lâmpadas de 5w iluminavam a entrada de cada *goalbox*. No pré-treinamento, os animais foram habituados ao labirinto, permanecendo 10 minutos/dia, durante dois dias. No treinamento de discriminação, durante o qual a recompensa (*pellets* de ração) estava disponível em apenas um dos braços, este era iluminado e permanecia assim até o fim da sessão. Caso entrasse no braço recompensado, era permitido e comesse e, então, retirado. Caso contrário era retido por 20 segundos até ser liberado. A ordem dos braços recompensados era randômica, com igual número de vezes para cada braço. Nesta fase, havia um total de 10 tentativas por sessão, uma sessão por dia até que os animais atingissem o critério (7 tentativas corretas/sessão), num mínimo de quatro e máximo de dez sessões.

Na fase de discriminação tardia, a luz no braço recompensado acendia e apagava no braço recompensado. Somente depois, o animal era liberado da “startbox”. O número total de acertos em 4 sessões, 10 tentativas por sessão, era o parâmetro avaliado.

4.7 Análise estatística

Foram realizados testes não paramétricos (Kruskal-Wallis, Dunn's e Mann-Whitney) para a análise estatística dos testes. O programa de computador usado foi o Graph Pad Instat. Foi utilizado nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica dos efeitos da lesão por etanol em camundongos

A figura 7 mostra cortes histológicos de córtex cerebral de camundongos lesados por etanol no 10º dia pós-natal (b) e de animais controles (a) corados por Hematoxilina e Eosina. Não observou-se lesões histológicas no grupo submetido à aplicação de etanol e os neurônios encontram-se bem preservados e sem sinais de picnose ou vacuolização.

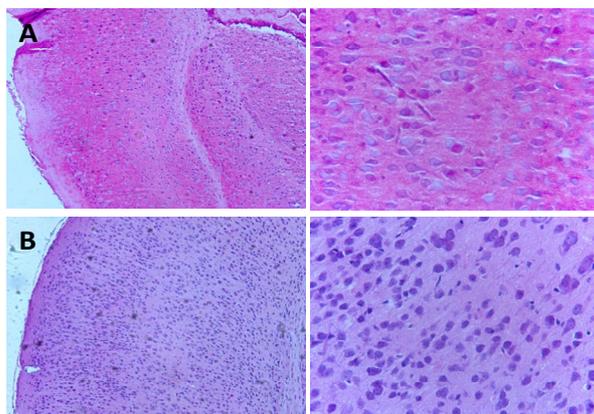


Figura 7 – Cortes histológicos de córtex cerebral de camundongos. Os camundongos foram submetidos a injeção subcutânea de etanol (2x2,5g/kg *s.c.*) ou solução salina 0,9% em volume equivalente no 10º dia pós-natal. No 11º dia, foram sacrificados e tiveram seus cérebros fixados, montados em parafina e corados pelo método da Hematoxilina-Eosina. Foram fotografados no menor (100 x) e maior (400 x) aumento. (A) salina; (B) etanol.

5.2 Efeito do tratamento diário com Metilfenidato ou Reboxetina na atenção e memória de camundongos submetidos à lesão por etanol no teste do *T-maze*

Os estudos comportamentais foram realizados como descrito anteriormente. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM observados no número de animais em parênteses.

O teste do *T-maze* é dividido em duas fases que envolvem respectivamente atenção e memória de trabalho/atencional. Durante a primeira fase, denominada de aquisição de discriminação, a recompensa (*pellets* de ração) estava disponível em apenas um dos braços, este era iluminado e permanecia assim até o fim da sessão. Caso entrasse no braço recompensado, era permitido que o animal comesse e, então, este era retirado do compartimento. Caso contrário, o animal era retido por 20 segundos até ser liberado. A ordem dos braços recompensados era aleatória, com igual número de vezes para cada braço. Nesta fase, havia um total de 10 tentativas por sessão, uma sessão por dia até que os animais atingissem o critério (7 tentativas corretas/sessão), num mínimo de quatro e máximo de dez sessões. Nesta fase, como evidenciado na figura 8 a, não houve diferença significativa entre os sexos em relação ao desempenho no teste do *T-maze* (Número de sessões para aprender **MACHOS CONT.** 1,5 \pm 0,5; **FÊMEAS CONT** 1,5 \pm 0,5; **MACHOS ET** 6,5 \pm 1,36; **FÊMEAS ET** 8,0 \pm 1,14). Os animais (n=11) lesados por etanol (7,18 \pm 0,32) necessitaram de um número de tentativas significativamente ($p < 0,001$) maior quando comparados ao grupo controle (1,5 \pm 0,32) para aprender, o que reflete um déficit de atenção. Este efeito danoso foi revertido tanto pelo Metilfenidato (3,14 \pm 0,88) quanto pela Reboxetina (1,55 \pm 0,33), como mostra a figura 8b. O tratamento de animais controle com Metilfenidato ou Reboxetina não modificou o seu desempenho nesta fase do teste.

A fase de discriminação tardia do teste do *T-maze*, ilustrada na figura 8c, avalia memória de trabalho, dependente de atenção. Nesta fase do experimento, a luz no braço recompensado acendia e apagava antes que o animal fosse liberado da “*startbox*”. O animal deveria, portanto, ter aprendido a associar o braço iluminado com a recompensa, entender a regra de alternância dos braços recompensados e memorizar onde a luz havia acendido. O número total de acertos em 4 sessões, 10 tentativas por sessão, era o parâmetro avaliado. Nesta fase, os animais lesados por etanol (n=11) apresentaram significativo ($p < 0,05$) déficit de memória quando comparados ao grupo controle. O efeito danoso foi revertido pelo

Metilfenidato, mas não pela Reboxetina (N° de acertos - **CONT-** 25,78±0,86; **ET-** 21,27±1,02; **MFD+ET-** 25,14±1,03; **RBX+ET-** 21,88±1,00; **MFD-** 24,29±1,08; **RBX-** 22,4±1,03). O tratamento de animais controles (não-lesados por etanol) com Metilfenidato ou Reboxetina não modificou o seu desempenho nesta fase do teste.

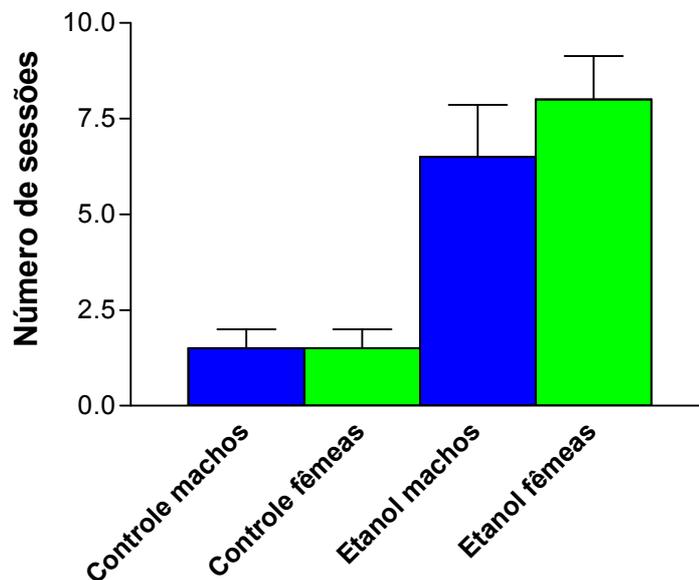


Figura 8a – Influência do sexo no aprendizado de camundongos lesados por etanol e controles no Teste do *T-Maze*. Camundongos Swiss machos e fêmeas (20-25g, 30 dias, n=4-6) foram submetidos a lesão por etanol (2x2,5g/Kg *s.c.*) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) no 10º dia pós-natal. No 30º dia pós-natal, foram avaliados no teste do *T-Maze*.

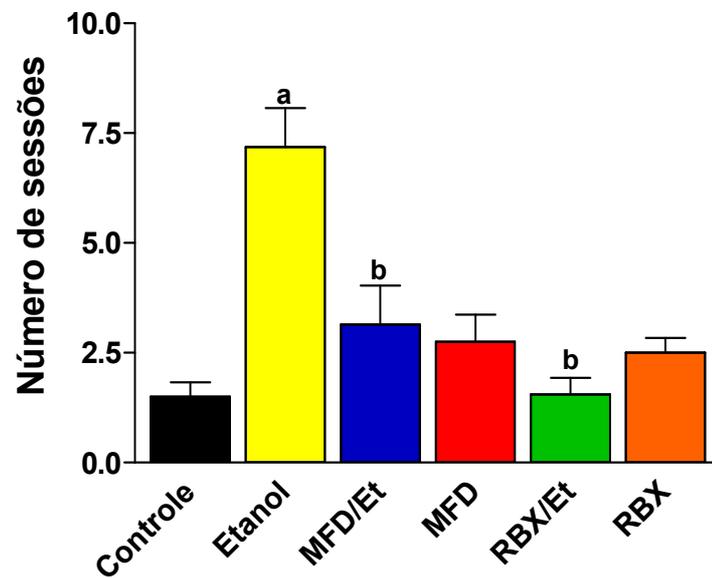


Figura 8b – Efeito do tratamento diário com Metilfenidato ou Reboxetina na atenção durante a fase de aquisição de discriminação de animais no Teste do *T-Maze*. Camundongos Swiss machos e fêmeas (20-25g, 30 dias) foram submetidos a lesão por etanol (2x2,5g/Kg *s.c.*) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) foram tratados 30 minutos antes de cada sessão de testes com MFD (2,5mg/kg *v.o.*) ou RBX (10mg/kg *v.o.*). ^a vs controle. ^b vs etanol ($p < 0,01$, Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

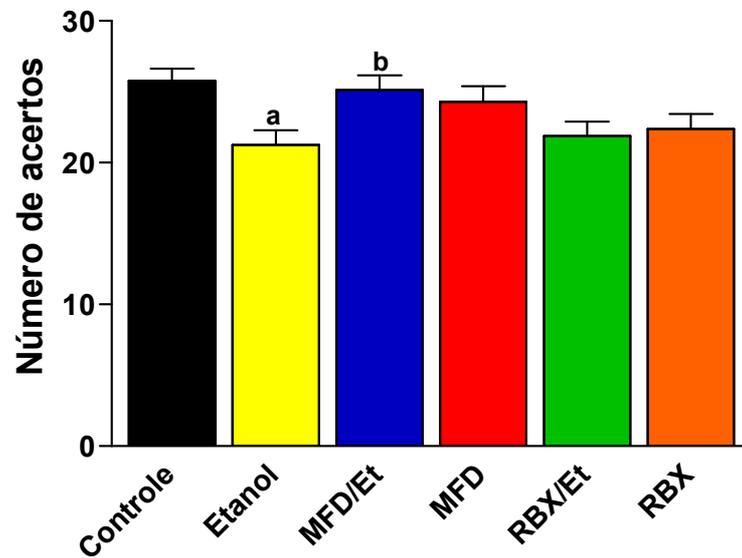


Figura 8c – Efeito do tratamento diário com Metilfenidato ou Reboxetina na memória de trabalho durante a fase de discriminação tardia no Teste do *T-Maze*. Camundongos Swiss (n=7-11) machos e fêmeas (20-25g, 30 dias) foram submetidos a lesão por etanol (2x2,5g/Kg *s.c.*) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) no 10º PND foram tratados 30 minutos antes de cada sessão de testes com MFD (2,5mg/kg *v.o.*) ou RBX (10mg/kg *v.o.*) durante 4 dias. Os animais controles foram tratados com volume equivalente de solução salina 0,9%. ^a vs controle, ^b vs etanol (p<0,05, Teste de Mann-Whitney).

5.3 Efeito do Metilfenidato ou Reboxetina na aquisição da memória aversiva de camundongos submetidos à lesão por etanol no teste da Esquiva Passiva

No teste da esquiva passiva os animais aprendem a evitar o choque (treino) não entrando no lado escuro do aparelho, quando avaliados 15 minutos após o choque (memória recente) ou 24 horas após o choque (memória tardia). A figura mostra que todos os grupos apresentaram uma boa retenção da memória, tanto na fase imediata (memória recente), quanto na fase de consolidação (memória tardia), quando comparadas ao treino. Não houve diferenças significativas entre os grupos na memória recente quando comparados ao grupo controle, conforme demonstrado nas figuras 9a e 9b (**Tempo de Latência em seg.- CONT-** 178,0±41,83; **ET-** 197,2±21,60; **MFD+ET-** 161,3±50,37; **RBX+ET-** 182,5±46,39; **MFD-** 255,4±20,77; **RBX-** 298,0±0,0). Da mesma maneira, não houve alterações significativas quando comparados ao grupo controle (**Tempo de Latência em seg.- CONT-** 276,4±21,60; **ET-** 230,1±18,7; **MFD+ET-** 271,1±12,77; **RBX+ET-** 268,9±29,11; **MFD-** 220,3±39,59; **RBX-** 270,9±27,13).

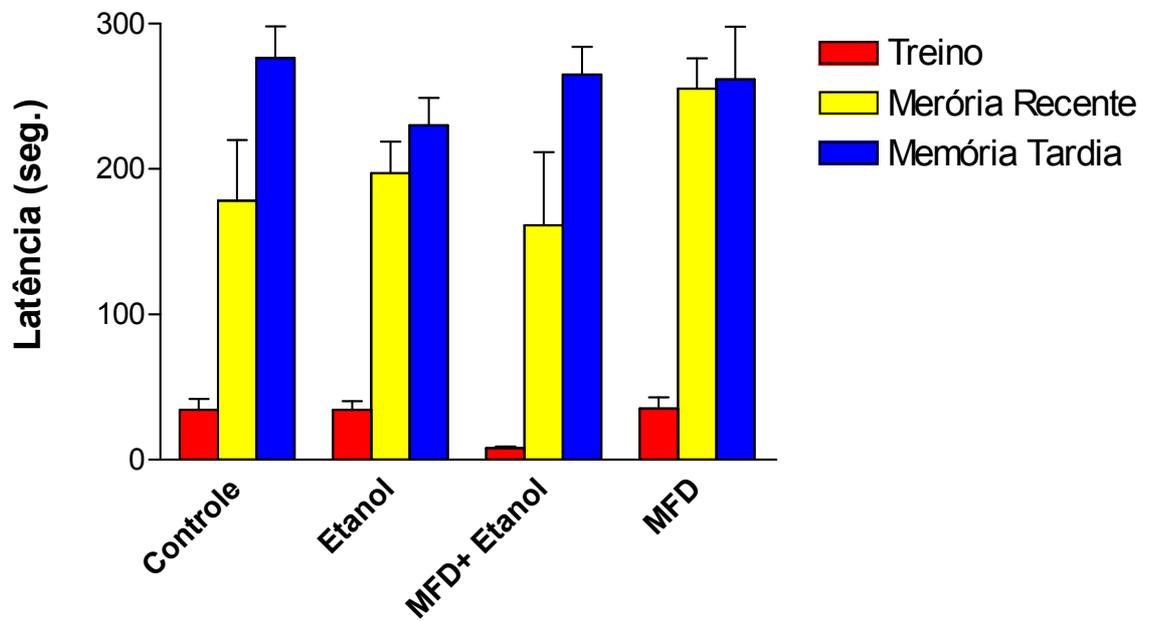


Figura 9a – Efeito do tratamento diário com Metilfenidato na aquisição da memória aversiva de camundongos submetidos a lesão por etanol no Teste da Esquiva Passiva. Camundongos Swiss (n=8) machos e fêmeas (20-25g, 30 dias) submetidos a lesão por etanol (2x2,5g/Kg *s.c.*) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) foram tratados 30 minutos antes dos testes com MFD (2,5mg/kg *v.o.*). Os animais controles foram tratados com volume equivalente de solução salina 0,9%. Os valores acima estão expressos como média \pm EPM.

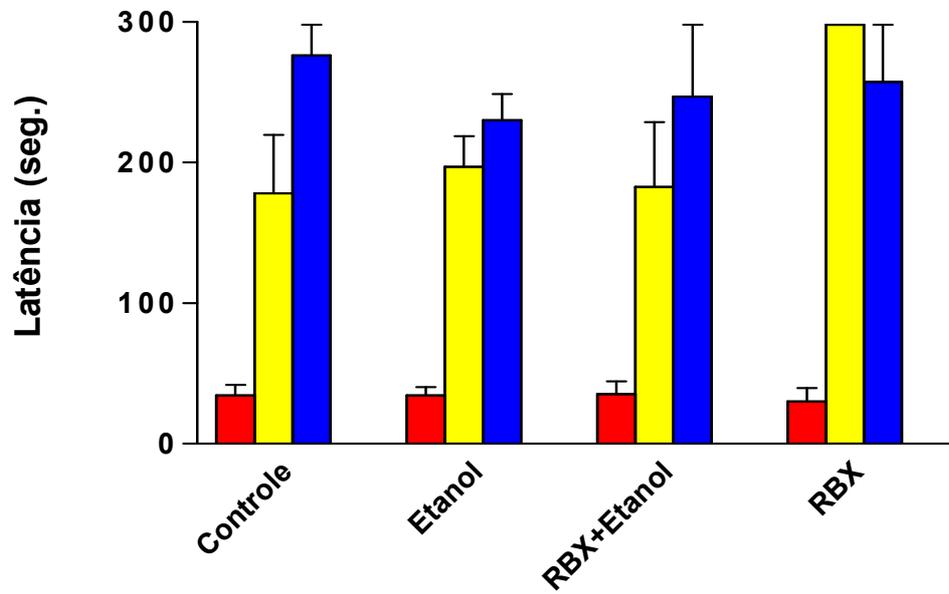


Figura 9b – Efeito do tratamento diário com Reboxetina na aquisição da memória aversiva de camundongos (n=10) submetidos a lesão por etanol no Teste da Esquiva Passiva. Camundongos Swiss (n=8) machos e fêmeas (20-25g, 30 dias) submetidos a lesão por etanol (2x2,5g/Kg *s.c.*) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) foram tratados 30 minutos antes dos testes com RBX (10mg/kg *v.o.*). Os animais controles foram tratados com volume equivalente de solução salina 0,9%. Os valores acima estão expressos como média \pm EPM.

5.4 Efeito do tratamento com Metilfenidato ou Reboxetina na aquisição da memória de trabalho de camundongos submetidos à lesão por etanol no teste do *T-maze*

Esse teste avalia a memória de trabalho e o aprendizado. O animal deve alternar espontaneamente quando colocado num labirinto em forma de Y. Todas as entradas em cada braço são sequencialmente anotadas, assim como o número total de entradas e a seqüência de entradas, entrando em braços diferentes a cada vez. O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço entraram por último. Os animais que foram submetidos à lesão por etanol no período neonatal (n=7) apresentaram um pior desempenho no teste quando comparados ao grupo controle, evidenciando assim um significativo ($p < 0,01$, Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's) déficit de memória de trabalho e aprendizado (**Número de Alternâncias Corretas CONT** 73,28±4,75; **ET** 43,53±4,65). Este déficit foi revertido pelo tratamento com Metilfenidato, mas não pela Reboxetina (**Número de Alternâncias Corretas MFD+ET** 60,57±1,92; **RBX+ET** 54,63±2,80).

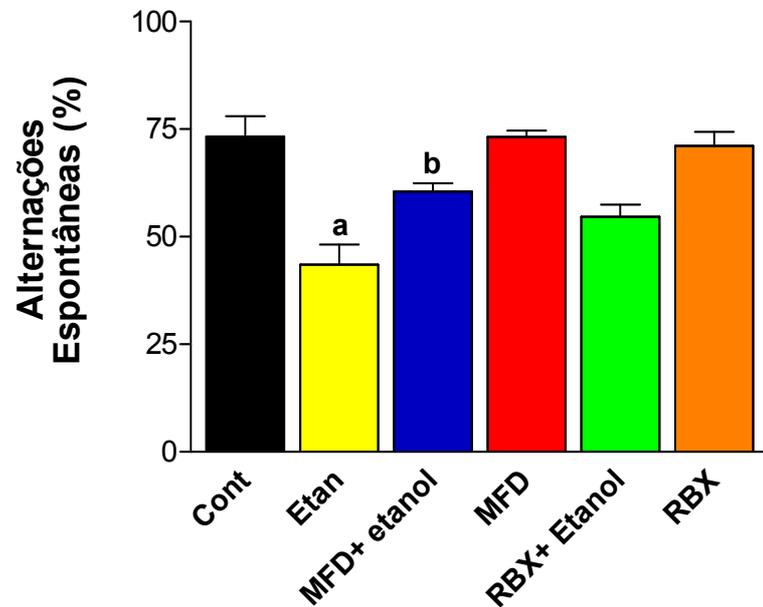


Figura 10 – Efeito do tratamento agudo com Metilfenidato ou Reboxetina na aquisição da memória de trabalho de camundongos submetidos a lesão por etanol no Teste do *Y-Maze*. Camundongos Swiss (n=5-12) machos e fêmeas (20-25g, 30 dias) foram submetidos a lesão por etanol (2x2,5g/Kg *s.c.*) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) e tratados 30 minutos antes dos testes com MFD (2,5mg/kg *v.o.*) ou RBX (10mg/kg *v.o.*). Os animais controles foram tratados com volume equivalente de solução salina 0,9%. Os valores representam a média \pm EPM e o número de animais observados em parênteses. ^a vs. controle, ^b vs. etanol (P<0.01, Testes de Kruskal-Wallis, Dunn's Mann-Whitney).

5.5 Efeito do Metilfenidato e da Reboxetina na atividade locomotora de camundongos submetidos à lesão por etanol no Teste de Campo Aberto

No teste do campo aberto, os camundongos que foram submetidos a lesão por etanol no 10º PND apresentaram uma diminuição significativa no número de cruzamentos, evidenciando uma menor atividade locomotora horizontal ($p < 0,05$. Teste de Mann-Whitney). Este efeito deletério foi revertido tanto pelo Metilfenidato, quanto pela Reboxetina, como mostrado nas figuras 11a e 11b (**Número de Cruzamentos** CONT 93,59±6,38; ET 66,52±5,87; MFD+ET 98,14±9,23; MFD 67,25±5,48; RBX+ET 77,13±7,68; RBX 83,14±9,64).

No comportamento exploratório vertical, aqui avaliado com o número de *rearings*, não observou-se diferença entre os camundongos lesados pelo etanol e o grupo controle. De maneira interessante, o tratamento de camundongos lesados pelo etanol com Metilfenidato e Reboxetina aumentou ($p < 0,01$ Teste de Kruskal-Wallis e Dunn's) o comportamento exploratório vertical neste grupo quando comparados aos controles. Quando as drogas foram aplicadas aos animais controles, elas não modificaram a atividade locomotora neste grupo (**Número de Rearings** CONT 11,12±1,78; ET 9,85±1,20; MFD+ET 22,43±2,95; MFD 8,50±0,75; RBX+ET 32,63±7,10; RBX 11,0±2,82).

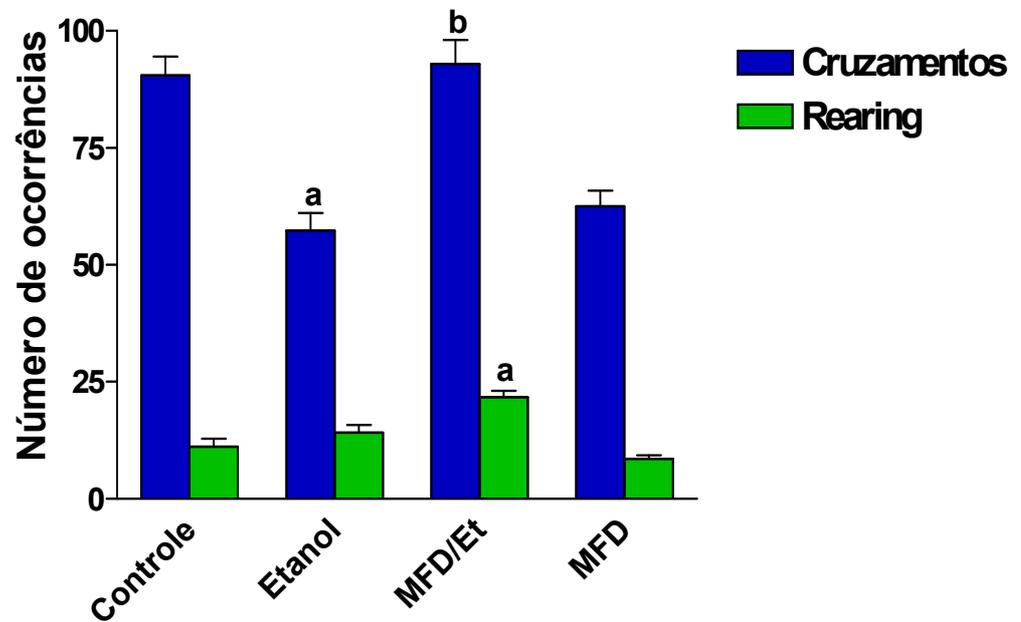


Figura 11a – Efeito do tratamento agudo com Metilfenidato na atividade locomotora de camundongos submetidos à lesão por etanol no Teste de Campo Aberto. Camundongos Swiss ($n=10-30$) machos e fêmeas (20-25g, 30 dias) foram submetidos a lesão por etanol ($2 \times 2,5\text{g/Kg s.c.}$) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) e tratados 30 minutos dos testes com MFD ($2,5\text{mg/kg v.o.}$). Os animais controles foram tratados com volume equivalente de solução salina 0,9%. Os valores representam a média \pm EPM e o número de animais observados em parênteses. ^a vs controle, ^b vs. etanol ($p < 0,01$, Teste de Kruskal-Wallis/Dunns).

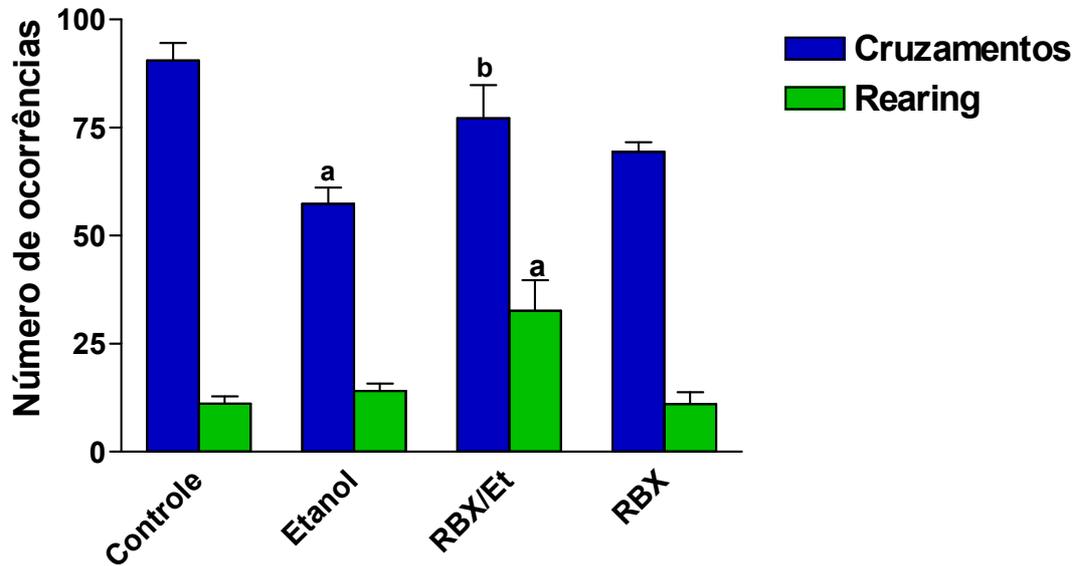


Figura 11b – Efeito do tratamento agudo com Reboxetina na atividade locomotora de camundongos submetidos à lesão por etanol no Teste de Campo Aberto. Camundongos Swiss (n=10-30) machos e fêmeas (20-25g, 30 dias) foram submetidos a lesão por etanol (2x2,5g/Kg *s.c.*) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) e tratados 30 minutos dos testes com RBX (10mg/kg *v.o.*). Os animais controles foram tratados com volume equivalente de solução salina 0,9%. Os valores representam a média ± EPM e o número de animais observados em parênteses. ^a vs controle, ^b vs. Etanol (p<0,05, Teste de Kruskal-Wallis/Dunns).

5.6 Efeito do tratamento com Metilfenidato ou Reboxetina na ansiedade de camundongos lesados por etanol no Teste do Claro-Escuro

O teste do claro-escuro consiste em colocar o animal na parte clara de uma caixa com dois lados (claro e escuro) onde são registrados os seguintes parâmetros: a latência de passagem para o lado escuro da caixa, o tempo despendido em cada seção da caixa e número de transições entre as duas áreas da caixa por um período de cinco minutos. Um tempo maior de permanência no lado escuro da caixa indica comportamento ansiogênico, enquanto um tempo maior no compartimento claro da caixa indica atividade ansiolítica. O ansiolítico Diazepam foi utilizado como droga-teste para verificar a validade do experimento. Conforme ilustrado na figura 12a, não houve diferença significativa entre os animais controles e aqueles submetidos à lesão por etanol no que se refere ao tempo de latência para passar para o lado escuro da caixa (**Tempo de Latência CONT** 7,25±2,12; **DZP** 23,97±9,06; **ET** 4,88±1,13). Os animais submetidos à lesão por etanol apresentaram um comportamento ansiogênico ($p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney) quando comparados aos controles. Este comportamento foi mitigado pelo tratamento com Reboxetina, mas não pelo Metilfenidato. De maneira interessante, em animais não lesados por etanol, a Reboxetina e o Metilfenidato tiveram ação ansiogênica neste teste, como demonstrado na figura 12b (**Tempo de permanência no Claro CONT** 149±5,99; **DZP** 236,1±16,58; **ET** 115,4±4,27; **MFD+ET** 120,1±6,81; **MFD** 98,6±6,27; **RBX+ET** 149,1±2,55; **RBX** 76,6±7,40). Com relação à atividade locomotora, aqui medida pelo número de travessias entre os ambientes claro e escuro na caixa, os camundongos lesados pelo etanol apresentaram hipoatividade quando comparados aos controles. Este efeito danoso foi revertido tanto pelo Metilfenidato quanto pela Reboxetina ($p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney) como mostra a figura 6c. Os animais não-lesados pelo etanol que receberam Reboxetina apresentaram atividade motora diminuída quando comparados aos controles (**Número de Travessias CONT** 23,43±2,1; **DZP** 19,33±1,76; **ET** 17,67±0,7; **MFD+ET** 33,7±2,48; **MFD** 19,6±2,01; **RBX+ET** 19,78±1,05; **RBX** 9,9±1,17).

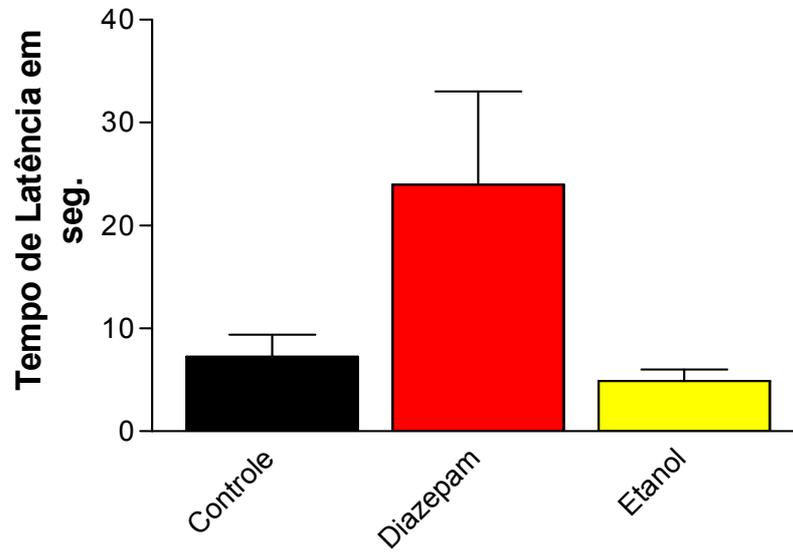


Figura 12a – Efeito da lesão por etanol no tempo de latência no Teste do Claro-Escuro. Camundongos Swiss (n=7-10) machos e fêmeas (20-25g, 30 dias) submetidos a lesão por etanol (2x2,5g/Kg *s.c.*) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) foram avaliados quanto ao tempo de latência no teste do claro-escuro. Os valores estão expressos como média ± EPM.

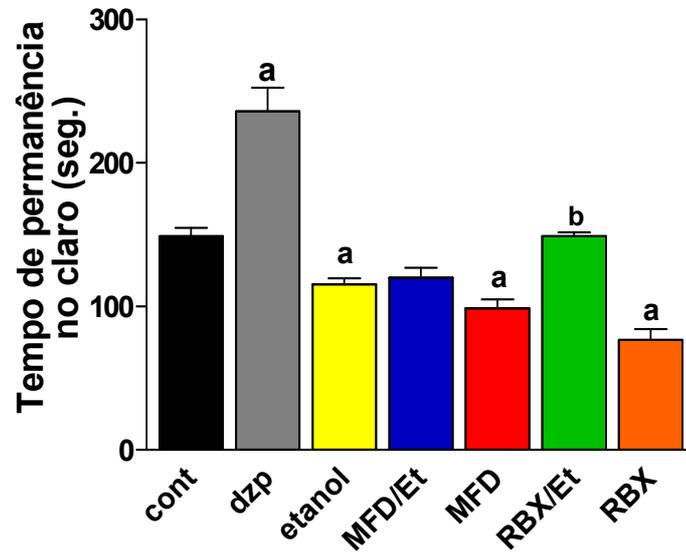


Figura 12b – Efeito do tratamento agudo com Metilfenidato ou Reboxetina na ansiedade de camundongos lesados por etanol no Teste do Claro-Escuro. Camundongos Swiss (n=7-10) machos e fêmeas (20-25g, 30 dias) submetidos a lesão por etanol (2x2,5g/Kg *s.c.*) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) foram tratados 30 minutos antes dos testes com MFD (2,5mg/kg *v.o.*) ou RBX (10mg/kg *v.o.*). Os animais controles foram tratados com volume equivalente de solução salina 0,9%. Os valores estão expressos como média \pm EPM. ^a vs controle, ^b vs. etanol ($p < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis, Dunn's e Mann-Whitney).

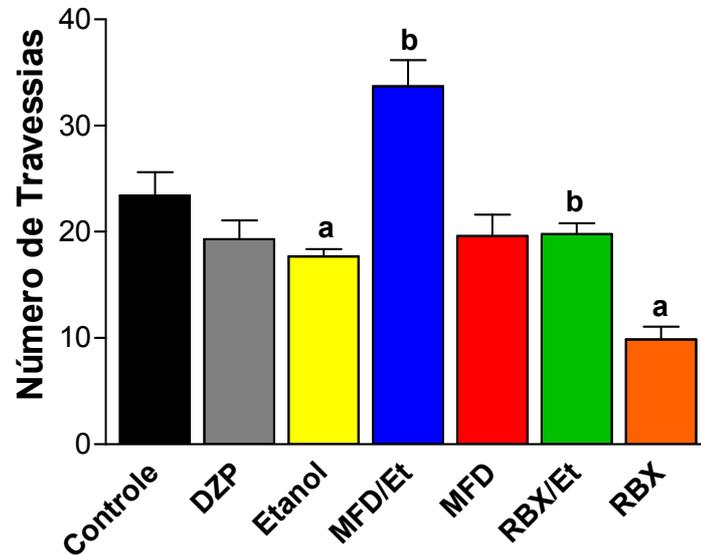


Figura 12c – Efeito do tratamento agudo com Metilfenidato ou Reboxetina na atividade locomotora de camundongos lesados por etanol no Teste do Claro-Escuro. Camundongos Swiss (n=7-10) machos e fêmeas (20-25g, 30 dias) submetidos a lesão por etanol (2x2,5g/Kg *s.c.*) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) foram tratados 30 minutos antes dos testes com MFD (2,5mg/kg *v.o.*) ou RBX (10mg/kg *v.o.*). Os animais controles foram tratados com volume equivalente de solução salina 0,9%. Os valores estão expressos como média ± EPM. ^a vs controle, ^b vs. etanol ($p < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis, Dunn's e Mann-Whitney).

5.7 Efeito do Metilfenidato e da Reboxetina na ansiedade de camundongos lesados pelo etanol no teste *do Plus Maze*

Neste teste, o animal é colocado no labirinto de frente para o braço aberto e a locomoção entre os braços abertos e fechados é observada. A porcentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos em relação ao somatório do tempo de permanência nos braços abertos e fechados foi calculada, sendo o quociente obtido multiplicado por 100. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços fechados revela um efeito ansiolítico. O Diazepam, na dose de 1mg/Kg via i.p., foi utilizado como droga padrão, a fim de se verificar a confiabilidade do teste. Os animais lesados por etanol apresentaram um comportamento ansiogênico ($p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney), em relação aos controles. Este efeito deletério foi revertido pela Reboxetina, mas não pelo Metilfenidato. O número de travessias, indicativo de atividade locomotora, não foi diferente entre os grupos avaliados. Os dados estão representados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Avaliação de ansiedade no teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*).

Grupos	Número de travessias	TPBA (tempo em seg.)	TPBF (tempo em seg.)
Controle	13,50±1,12	88,06±12,52 (34,15)	169,80±8,62 (65,85)
Diazepam	21,43±1,76	173,90±5,29 ^a (62,83)	102,90±6,80 (37,17)
Etanol	12,6±1,07	50,53±5,99 ^a (19,22)	212,40±9,23 (80,78)
Metilfenidato+Etanol	18,00±1,72	39,86±12,00 (14,43)	236,40±15,54 (85,57)
Metilfenidato	15,00±0,98	50,50±10,43 (20,42)	196,8±13,8 (79,58)
Reboxetina+ Etanol	18,14±2,01 ^b	86,29±9,49 (34,53)	163,60±13,80 (65,47)
Reboxetina	14,70±1,35	57,1±10,22 (21,32)	210,70±10,59 (78,68)

Avaliação de ansiedade em camundongos submetidos à lesão por etanol no teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*). Os experimentos foram realizados em Camundongos Swiss lesados por etanol (n=25) (2 x 2,5g/Kg *s.c.*) no 10º dia pós-natal. Os controles receberam volume equivalente de solução salina 0,9% *s.c.* Trinta minutos antes do teste, os animais foram tratados com MFD (2,5mg/kg *v.o.*) ou RBX (10mg/kg *v.o.*). Valores expressos em média ±EPM. Percentagem de tempo gasto em cada braço entre parênteses. ^a vs controle, ^b vs etanol (p<0,05, Teste de Mann-Whitney).

5.8 Efeito do tratamento com Metilfenidato ou Reboxetina na depressão em camundongos submetidos à lesão por etanol no Teste do Nado Forçado

O teste do nado forçado avalia um possível efeito antidepressivo de uma substância. O experimento inclui duas exposições a um tanque de água, espaçadas de 24 horas. Durante a primeira exposição, os animais, não tratados, são colocados no tanque, um por vez, e deixados por 15 minutos. Durante a segunda exposição (teste propriamente dito) os animais devem ser tratados e colocados no tanque onde o tempo de imobilidade deve ser contado durante cinco minutos. O animal deve ser considerado imóvel quando permanece flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água. Os antidepressivos devem reduzir o tempo de imobilidade apresentado pelos animais. Os camundongos lesados por etanol no período neonatal apresentaram um tempo significativamente ($p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney) maior de imobilidade, evidenciando um efeito depressor quando comparados aos controles. Este efeito não foi revertido nem pelo Metilfenidato, nem pela Reboxetina. A segunda, aliás, apresentou um efeito depressivo quando administrada a animais não lesados pelo etanol quando comparados aos controles. (**Tempo de Imobilidade** CONT 74,17±23,43; ET 141,8±19,3; MFD+ET 178,9±12,43; MFD 156,1±17,32; RBX+ET 118,5±18,25; RBX 183,2±15,6). Para avaliarmos se o efeito depressor da Reboxetina no teste era devido ao fato de que a droga necessitaria de um tempo maior de tratamento para exercer seu efeito antidepressivo, a droga foi administrada durante 15 dias e o teste foi repetido. Contudo, os resultados não modificaram.

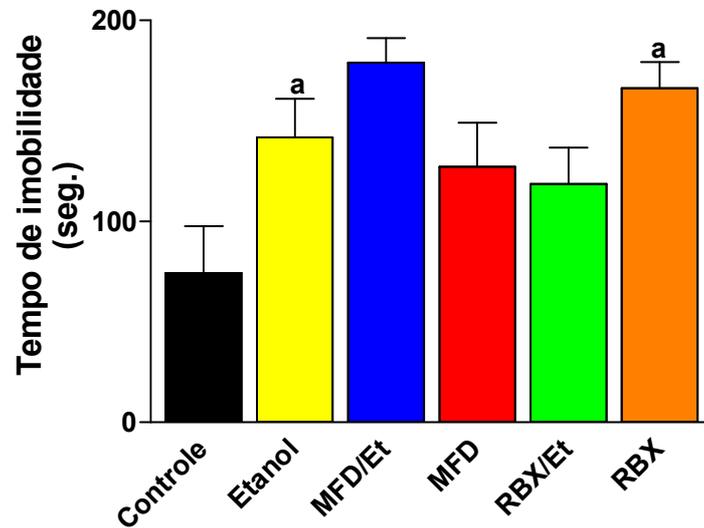


Figura 13 – Avaliação de depressão em camundongos submetidos à lesão por etanol no Teste do Nado Forçado. Camundongos Swiss (n=8) machos e fêmeas (20-25g, 30 dias) submetidos a lesão por etanol (2x2,5g/Kg *s.c.*) ou injeção de solução salina 0,9% (volume equivalente *s.c.*) foram tratados 30 minutos antes dos testes com MFD (2,5mg/kg *v.o.*) ou RBX (10mg/kg *v.o.*). Os animais controles foram tratados com volume equivalente de solução salina 0,9%. Os valores representam a média \pm EPM. ^a vs controle ($p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney).

6 DISCUSSÃO

O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é uma desordem cognitiva e do desenvolvimento neurocomportamental que afeta aproximadamente 3 a 5% das crianças em idade escolar (BARKLEY, 1997), sendo hoje o transtorno neurocomportamental mais diagnosticado em crianças mundialmente (APA, 2000). O transtorno é caracterizado pela presença de sintomas como hiperatividade, dificuldades em manter o foco de atenção, distractibilidade e impulsividade (APA, 2000).

A fisiopatologia da desordem permanece incompletamente esclarecida, com uma complexa interação de fatores genéticos, ambientais e neurofisiológicos (RAPPORT *et al.*, 2000; PALOMO *et al.*, 2003). Evidências crescentes suportam a transmissão familiar, com provável componente de hereditariedade (VOELLER, 1994), o que também é refletido pelas associações entre irmãos (FARAONE *et al.*, 1995), pais (FRICK *et al.*, 1995) e mães (SCHACHER e WACHSMUTH, 1990; FARAONE *et al.*, 2003). Dentre os genes candidatos, vários estudos suportam o envolvimento do sistema dopaminérgico na etiologia do distúrbio (SWANSON *et al.*, 1974).

Dentre os fatores ambientais, a exposição pré-natal ao álcool parece ter um papel importante, uma vez que está associada a uma série de alterações no cérebro e no desenvolvimento comportamental. Crianças expostas ao álcool no período pré-natal podem apresentar hiperatividade, disfunção motora, problemas de linguagem e déficits de aprendizado (MATTSON e RILEY, 1998; STREISSGUTH, 1986). Em ratos e camundongos, o período de crescimento cerebral, caracterizado por um rápido aumento no peso cerebral, proliferação de células gliais, alongamento de axônios neuronais e sinaptogênese, ocorre nas duas semanas que se seguem ao nascimento (BYRNES *et al.*, 2001). A apoptose fisiológica também faz parte deste período de desenvolvimento e alterações neste processo podem ter conseqüências na configuração de morte celular e alterar os mecanismos de desenvolvimento dos circuitos neuronais, levando a transtornos neurocomportamentais (OLNEY *et al.*, 2000).

Estudos como o de RATHBUN e DRUSE (1985), mostram que a exposição pré-natal ao álcool leva a anormalidades na função do sistema dopaminérgico no mesencéfalo -, causando uma redução na captação de dopamina e na sua ligação aos sítios receptores, além de diminuição na quantidade de dopamina nas áreas somatodendríticas e terminais em animais. Pode haver também mudança na morfologia dos neurônios dopaminérgicos, isto é, corpos celulares menores e retardo no crescimento dendrítico (SHETTY *et al.*, 1993). Estes achados são confirmados por Carneiro *et al.* (2005), que observaram que a prole de ratas expostas ao álcool no período gestacional apresentava alterações bioquímicas nas redes dopaminérgicas, com diminuição significativa de receptores dopaminérgicos D1 e D2.

Em termos neurofisiológicos, diferentes áreas cerebrais parecem estar afetadas em portadores de TDAH, particularmente o córtex pré-frontal e suas conexões com outras estruturas corticais (como o córtex parietal) e subcorticais, como os gânglios da base. (DUNCAN e OWEN, 2002; POSNER e PETERSEN, 1990). Por ser o córtex pré-frontal área de extensa inervação dopaminérgica e noradrenérgica, é de se esperar que estes neurotransmissores estejam alterados em portadores de déficit de atenção. A catecolamina dopamina parece ter um papel fundamental na etiologia do déficit de atenção. O TDAH resulta, em parte, de déficits no sistema Dopaminérgico em estruturas corticais, como o córtex pré-frontal (SULLIVAN e BRAKE, 2003) e áreas subcorticais, como o Núcleo Accumbens (Nac) e o estriado (RUSSEL *et al.*, 1995). Pliska *et al.* (1996) sugerem que a rede noradrenérgica central também parece estar desregulada em portadores de TDAH e que níveis adequados de noradrenalina (e dopamina) são necessários para o ótimo funcionamento do cortex pré-frontal (PFC). A eficácia de drogas psicoestimulantes como o Metilfenidato, que facilitam a liberação e disponibilidade sináptica de Dopamina (DA) (PLISZKA *et al.*, 1996; FLECKENSTEIN *et al.*, 2000), além de outros neurotransmissores monoaminérgicos, notadamente Noradrenalina (NA) e Serotonina (5-HT) comprovam a importância destes neurotransmissores na fisiopatologia do transtorno (BIEDERMAN e SPENCER, 1999).

O diagnóstico do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) baseia-se em critérios comportamentais, de modo que modelos animais do distúrbio devem mimetizar os sintomas-chave de hiperatividade, impulsividade e dificuldades em manter a atenção. Sendo o TDAH um distúrbio heterogêneo, onde frequentemente duas crianças com o

mesmo distúrbio têm quadros clínicos diferentes, não é surpresa que diversos modelos animais envolvendo déficits em mecanismos neurais diferentes reproduzam os sintomas do transtorno (RUSSEL, 2007).

Quando modelos animais são utilizados para reproduzir condições clínicas, eles devem ser capazes de mimetizar os sintomas fundamentais da condição estudada, confirmar o racional teórico implicado na gênese do problema e predizer aspectos do comportamento, genética e neurobiologia da doença em questão (KOOJI e GLENNON, 2007). Dentre os modelos animais utilizados no estudo do TDAH, um dos mais difundidos é o rato espontaneamente hipertenso (SHR), por apresentar não só um comportamento desatento, mas também hiperatividade e impulsividade, além da presença de alterações em noradrenalina e dopamina (VAN DER KOOJI e GLENNON, 2007). Estas características no entanto parecem variar de acordo com o teste comportamental utilizado, comprometendo a validade do modelo (FERGUSON e CADA, 2003).

O modelo de exposição à toxinas durante o período de desenvolvimento cerebral também foi estudado por diversos autores. Dentre estas toxinas, o álcool é a mais largamente utilizada, já que a exposição pré-natal ao álcool pode sabidamente causar problemas de atenção, hiperatividade e déficits cognitivos. Fredriksson e Archer (2004) demonstraram que o comportamento disfuncional presente no TDAH poderia ser reproduzido em animais quando o etanol era aplicado nas duas primeiras semanas de vida do rato, equivalente ao terceiro trimestre do desenvolvimento do sistema nervoso central em humanos. Os animais lesados por etanol no período neonatal apresentaram déficits de performance e aprendizado no labirinto radial de oito entradas e no teste da plataforma submersa, sendo os déficits mais pronunciados nos últimos dias de teste, sugerindo problemas de memória tardia. Ainda, apresentaram inicialmente marcante hipoatividade seguida de hiperatividade motora. Estes sintomas foram mitigados por anfetamina, mas a resposta ao Metilfenidato não foi testada neste estudo. Este foi o modelo utilizado no presente trabalho, desta vez testado em camundongos. Outro diferencial inclui o fato de termos testado a resposta ao Metilfenidato, uma vez que as anfetaminas não se encontram disponíveis para este fim no mercado brasileiro, e também ao antidepressivo Reboxetina, um inibidor seletivo da recaptação de Noradrenalina, neurotransmissor que parece estar envolvido na gênese do distúrbio.

Fredriksson e Archer (2004), observaram alterações funcionais e degeneração celular após administração de etanol subcutâneo no 10º dia pós-natal em córtex parietal e tálamo dorso-lateral de ratos. No presente estudo, após receberem injeção subcutânea de etanol no 10º dia pós-natal, os animais foram sacrificados corados pelo método da hematoxilina-eosina a fim de se verificar se houve alterações na morfologia dos neurônios corticais. No entanto, não foram observados sinais indicativos de morte celular, como picnose ou vacuolização. Condizente com este achado, há estudos que demonstram que não parece haver perda de neurônios dopaminérgicos após a exposição ao etanol no período neonatal, mas sim uma redução da atividade espontânea destes neurônios, resultando em geração de potencial de ação e ativação insuficientes (XU e SHEN, 1999). Assim, haveria no TDAH não um déficit na morfologia dos neurônios, mas sim nos circuitos cerebrais, principalmente em vias dopaminérgicas e noradrenérgicas. Uma limitação do nosso achado inclui a técnica empregada para a visualização destes neurônios. Técnicas convencionais como a do método H-E são mais simples e podem ser utilizadas para inferir degeneração baseado em mudanças como a morfologia (encolhimento) do neurônio, vacuolização e hiper cromatismo. No entanto, estas alterações não são necessariamente indicativas de morte neuronal e podem resultar de artefatos, levando a falso-positivos. Além disso, também é possível que sejam "perdidos" neurônios em degeneração, já que todas as células se coram por este método e apenas diferenças morfológicas sutis existem entre células normais e em degeneração (SIESJO, 1981). Sob este aspecto, a técnica do Fluoro-Jade, utilizada nos trabalhos que mostram degeneração celular, parece ser mais adequada para detecção de morte neuronal.

Para testarmos a existência de desatenção, um dos sintomas cardinais no TDAH, foi utilizado teste de discriminação visual do *T-maze*, padronizado por Thomas *et al.*, 2004, utilizando animais expostos ao álcool no período pré-natal. Embora na clínica alguns estudos demonstrem um predomínio do transtorno em meninos em relação a meninas (SZATMARI *et al.*, 1989), outros sugerem que o tipo de sintomas encontrado poderia resultar neste viés diagnóstico (LAHEY *et al.*, 1994). Já que as meninas costumam apresentar mais o subtipo desatento, enquanto meninos são mais frequentemente hiperativos, fazendo com que sejam mais facilmente diagnosticados e referidos aos serviços de saúde. Biederman *et al.* (2005) sugerem que os correlatos clínicos do TDAH não são influenciados por gênero e que as diferenças em grupos atendidos na prática clínica podem ser causadas por vieses de referência. Condizente com esta hipótese na clínica, em nosso trabalho não foram observadas

diferenças entre os sexos na tarefa de atenção e memória do *T-maze*, de modo que ambos os sexos foram utilizados neste e nos demais testes comportamentais.

No nosso estudo, utilizamos o modelo padronizado por Fredriksson e Archer, 2004, com animais submetidos à lesão por etanol no período neonatal, equivalente ao terceiro trimestre de desenvolvimento cerebral em animais. Durante a primeira fase do teste do *T-maze* que avalia atenção, nossos camundongos lesados por etanol necessitaram de um maior número de tentativas até que atingissem a percentagem mínima de acertos, ou seja, fossem capazes de prestar atenção à pista visual e seguissem para o braço recompensado do aparelho em no mínimo sete de cada dez tentativas. Os nossos resultados encontram-se de acordo com os achados da literatura (HAUSKNECHT *et al.*, 2005; FREDRIKSSON e ARCHER, 2004; THOMAS *et al.*, 2004), que demonstram que os camundongos submetidos à lesão por etanol no período neonatal apresentam déficits de atenção e memória. Thomas *et al.*, 2004, utilizando o mesmo *T-maze* na prole de animais expostos ao álcool intra-útero, mostra que os déficits ocorrem não só durante a aquisição de discriminação, mas também na fase de discriminação tardia, onde os animais apresentam um menor número de acertos quando comparados ao grupo controle. Nesta segunda fase, onde a pista visual é extinta antes que os animais possam se dirigir ao braço recompensado, os nossos resultados estão mais uma vez em concordância com a literatura, já que nossos animais tiveram menos acertos quando comparados ao grupo controle, mostrando que apresentaram dificuldades de memorizar e reter a informação sobre onde a pista visual, e portanto o braço recompensado, se encontravam. Os efeitos danosos na atenção causados pela exposição pré-natal ao etanol foram, portanto, adequadamente reproduzidos quando os animais foram submetidos à lesão por etanol no período neonatal, equivalente ao desenvolvimento cerebral em humanos.

Com relação ao teste empregado, Robertson (2008) destaca que, se o animal foi capaz de executar a tarefa corretamente após um curto intervalo de tempo, ele não só memorizou a localização da recompensa no “treino” anterior, como aprendeu a regra de alternância entre os braços e inibiu respostas prematuras, não entrando no braço previamente recompensado. Ainda, foi capaz de manter o foco de atenção e desprezar distrações, como ser colocado e retirado do aparelho (ARNSTEN e DUDLEY, 2005). Como os nossos animais lesados por etanol, mesmo após terem aprendido a regra do teste na fase inicial continuaram a cometer mais erros na fase tardia por serem menos capazes de memorizar e de inibir respostas

prematuras e imprecisas, eles demonstraram ainda sinais de impulsividade (outro sintoma característico do TDAH), sendo, incapazes de inibir respostas, mesmo após terem aprendido o critério na fase inicial do teste.

Se a performance do animal deteriorar quando o intervalo entre as sessões de teste aumenta, como aconteceu no nosso experimento, isto também sugere déficits de memória de trabalho. Estudos como o de Winocur (1992), mostram que os danos ao córtex pré-frontal resultam em déficits em tarefas de discriminação tardia, como o *T-maze*, que são evidentes tanto em curtos intervalos quanto em intervalos mais prolongados. O autor faz ainda a distinção de que, embora tanto o hipocampo quanto o córtex pré-frontal estejam envolvidos na performance em tarefas de discriminação tardia, eles o fazem de maneira diferente. O dano ao córtex pré-frontal resulta em déficits durante todos os intervalos, incluindo os mais curtos e declinando à medida que o intervalo aumenta como também acontece em controles. Em contraste, quando existe dano ao hipocampo, não há nenhum prejuízo em intervalos curtos, mas um rápido declínio na performance quando o intervalo de tempo é aumentado. Desta maneira, demonstramos que a lesão em camundongos por etanol no período neonatal acarreta danos ao córtex pré-frontal, como evidenciado pelos déficits de atenção e memória de trabalho no teste do *T-maze*.

Para confirmar este achado, sendo sabidamente o córtex pré-frontal área de ricas inervações dopaminérgicas e noradrenérgicas (VANDERSCHUREN *et al.*, 1999), foram avaliados a resposta ao metilfenidato, uma das drogas mais utilizadas no tratamento do déficit de atenção, e ao antidepressivo Reboxetina, inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina. O Metilfenidato mitigou os déficits de atenção induzidos pela lesão por etanol durante as duas fases do teste. Este achado está condizente com os resultados existentes na literatura (CHOONG e SHEN, 2004; SHEN e CHOONG, 2006) que mostram que o psicoestimulante normaliza a atividade de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral, que estaria diminuída em portadores de TDAH. Similarmente, na prática clínica, o Metilfenidato mostrou-se efetivo em aliviar os déficits de atenção em crianças portadoras de síndrome fetal alcoólica (OESTERHELD *et al.*, 1998). Já a Reboxetina melhorou apenas os déficits de atenção e aprendizado presentes durante a fase inicial de discriminação, mas não foi eficaz em reverter os déficits de memória durante a fase de discriminação tardia.

Na literatura, são escassos os estudos utilizando a Reboxetina em modelos animais de déficit de atenção. Viggiano e colaboradores (2004), analisando envolvimento da noradrenalina em modelos animais de déficit de atenção (ratos SHR e NHE - Naples High excitability), encontraram que a Reboxetina na dose de 10mg/kg (mesma dose utilizada neste trabalho), agiu de maneira diferente entre dois modelos, melhorando os déficits de maneira mais eficaz nos ratos SHR. Ainda, que ela não parecia alterar atenção ou atividade motora nos grupos controles. Estes dados sugerem que os sistemas noradrenérgicos presentes nestes dois modelos animais são distintos, refletindo substratos neurais diversos, com diferentes envolvimento de sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos. Assim, é possível que o nosso modelo responda melhor a drogas com ação dopaminérgica mais específica, como é o caso do Metilfenidato. Outro dado interessante é o de que, no que se refere ao tônus aminérgico, a ativação excessiva dos circuitos de vigília também pode estar presente no TDAH (ARNSTEN e DUDLEY, 2005). Tão deletária quanto a ativação diminuída, a hiperativação leva a comportamentos ansiosos que também levariam à falta de atenção (STAHL, 2008). Assim, o inibidor da recaptação de noradrenalina poderia ter ocasionado um excesso do neurotransmissor, o que acabaria por prejudicar a memória. Por último, há também a possibilidade de a Reboxetina não responder tão bem no modelo do *T-maze*, mas se equiparar ao Metilfenidato em outros testes que avaliem memória de trabalho, como é o caso do *Y-maze*.

O comportamento de alternância espontâneo no teste do *Y-maze* é implicado na memória de trabalho e classificado como memória de curta duração (SARTER *et al.*, 1988; PARADA-TURSKA E TURSKI, 1990). Quando os animais são colocados dentro do labirinto e deixados livres para explorar os três braços, eles tendem a alternar normalmente em níveis maiores do que os esperados apenas pelo acaso (DEMBER e FOWLER, 1959). Ratos com lesões do córtex pré-frontal medial apresentam taxas mais baixas de alterações espontâneas quando comparados a controles (DIVAC *et al.*, 1975). O mesmo efeito pode ser observado após lesões seletivas do córtex pré-límbico (DELATOUR e GISQUET-VERRIER, 1996). Parada-Turska e Turski, (1990) mostraram que antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA causavam prejuízos na memória de trabalho neste teste. Ueno *et al.* (2001), observaram déficits de memória de trabalho em modelo animal de déficit de atenção que foi revertido pelo Metilfenidato. No nosso estudo, os camundongos lesados pelo etanol no período neonatal apresentaram um déficit de memória de trabalho no teste to *Y-maze*, e este déficit foi mitigado pelo Metilfenidato, mas não pela Reboxetina. Pelo exposto acima, é

razoável dizer que os animais lesados por etanol apresentam comprometimento no córtex pré-frontal, com envolvimento de catecolaminas (dopamina e noradrenalina), uma vez que estes déficits foram mitigados pelo Metilfenidato. O fato de a Reboxetina não ter sido eficaz também neste teste nos faz pensar que a disfunção em circuitos dopaminérgicos tenha um papel mais importante do que o dano a circuitos noradrenérgicos no nosso modelo de lesão por etanol.

Somando-se ao córtex pré-frontal, alguns estudos demonstram o envolvimento do hipocampo em tarefas que exijam atenção alternada (STEVENS *et al.*, 1973; JOHNSON *et al.*, 1977). Além da memória espacial, que parece depender apenas do hipocampo (IZQUIERDO e cols, 1992, 1993), o sistema límbico é ainda importante na memória da esQUIVA inibitória dependente do hipocampo, amígdala e septo medial, e na memória de estímulo (susto) condicionado (DAVIS e CASSELL, 1994) ou esQUIVA da água motivada pelo choque (CAHIL e MCGAUGH, 1990) depende da amígdala.

Para avaliarmos se o dano hipocampal também estava presente em nosso modelo e poderia estar agindo como fator confundidor no teste do *Y-maze*, realizamos o teste da EsQUIVA-Passiva, que avalia memória aversiva. Os estudos até então realizados mostram resultados conflitantes no que se refere à existência de déficits de memória aversiva em animais expostos ao etanol no período de desenvolvimento cerebral. Enquanto Vigglicca *et al.*, (2004), mostram que animais expostos ao etanol no período pré-natal apresentam déficits de memória aversiva aos 40 dias de vida, outros autores mostram que este efeito parece diferir entre os sexos (BARRON e RILEY, 2001), ou ainda falham em encontrar estes déficits (NAYLOR *et al.*, 2001). No nosso estudo, os animais lesados por etanol não apresentaram déficits de memória recente ou tardia no teste da esQUIVA passiva. Isto sugere que, no nosso modelo, os déficits de atenção e memória não parecem ser causados por danos a estruturas hipocampais, mas sim a estruturas do córtex pré-frontal. De acordo com este achado, estudos de neuroimagem funcional em adultos com TDAH não mostram alterações hipocampais, mas sim uma hipoatividade frontal (LEVY *et al.*, 2001), com diminuição do volume no córtex pré-frontal (CASTELANOS *et al.*, 1996; HILL *et al.*, 2003), corpo caloso (FILIPEK *et al.*, 1997) e assimetria anormal e menor volume do núcleo caudado (CASTELANOS *et al.*, 1996b; FILIPEK *et al.*, 1997).

Além de déficits de atenção e memória de trabalho, com dificuldades de organização e planejamento, crianças portadoras do transtorno podem ainda apresentar hiperatividade. Da prática clínica, sabe-se que os sintomas de desatenção podem vir ou não acrescidos de hiperatividade e impulsividade, sendo os pacientes classificados como tendo o subtipo desatento, hiperativo/impulsivo ou combinado (quando os sintomas de desatenção e hiperatividade coexistem) (APA, 2000). No subtipo hiperativo, há ainda inquietação e impulsividade, levando a decisões precipitadas, respostas prematuras e labilidade emocional (MILLSTEIM *et al.*, 1997). Com a progressão da idade, os sintomas de hiperatividade tendem a diminuir, persistindo a desatenção, que se torna mais proeminente. Embora a hiperatividade diminua com o tempo, a maioria dos pacientes continua a sofrer com suas conseqüências na adolescência e vida adulta (FARAONE *et al.*, 2000). Sabemos ainda que crianças expostas ao álcool no período pré-natal podem apresentar hiperatividade, disfunção motora, problemas de linguagem e déficits de aprendizado (MATTSON e RILEY, 1998; STREISSGUTH, 1986).

Em ratos expostos ao etanol no período de neurodesenvolvimento, os dados com relação à atividade motora também são díspares. Fredriksson e Archer, (2004), avaliando o mesmo modelo utilizado neste estudo, observaram que os animais adultos apresentaram significativa hipoatividade durante os primeiros vinte minutos de testes, seguido por marcante e duradoura hiperatividade nos subseqüentes 40 minutos de observação. Esta hiperatividade foi revertida por anfetamina. Carneiro *et al.*, (2005), observando a prole de animais expostos ao etanol durante a gestação, encontraram uma hipoatividade importante no teste do campo aberto, com diminuição do comportamento exploratório horizontal e vertical. No nosso estudo, observamos que os animais lesados por etanol durante o neurodesenvolvimento apresentaram uma diminuição da atividade locomotora no comportamento exploratório horizontal, medido pelo número de cruzamentos, sem contudo apresentarem mudanças no comportamento exploratório vertical. Encontramos ainda que tanto o Metilfenidato quanto a Reboxetina foram eficazes em reverter os efeitos deletérios do etanol. Outro dado interessante foi o fato de que as duas drogas não tiveram efeito na atividade locomotora quando aplicadas a animais do grupo controle, mostrando que elas parecem agir de maneira diferente quando os circuitos neurais encontram-se disfuncionais. Uma crítica deve ser feita, no entanto, com relação ao fato de o nosso modelo não ter induzido nos animais todos os três sintomas cardinais do transtorno, i.e., desatenção, hiperatividade e impulsividade. Uma possibilidade é que, como aconteceu no estudo de Fredriksson e Archer, (2004), os nossos animais estariam inicialmente hipoativos e, se observados por mais tempo, desenvolveriam hiperatividade.

Outra, seria a de que os nossos animais, por serem já adultos, teriam menos hiperatividade do que se avaliássemos animais mais jovens. Ou ainda, que o nosso modelo seria válido apenas para o equivalente ao subtipo desatento de TDAH na prática clínica.

O TDAH está frequentemente presente junto a outros diagnósticos, como transtornos de conduta (TC) e opositor-desafiador (TOD), além das chamadas desordens internalizadoras como depressão e ansiedade (BIEDERMAN *et al.*, 1992). No geral, até 65% das crianças com TDAH terão uma ou mais comorbidades e entre 10 e 20% têm transtornos de humor, como ansiedade e depressão (BIEDERMAN, NEWCORN e SPRICH, 1991). O teste do claro-escuro é um dos testes comportamentais utilizados para a avaliação de ansiedade. Ele se baseia na aversão inata que os roedores têm a áreas iluminadas. No nosso estudo, observamos que, apesar de não haver diferença entre o tempo que os animais lesados e não lesados levaram para passar para o compartimento escuro, os animais submetidos à lesão por etanol permaneceram por mais tempo no compartimento escuro da caixa, indicando um comportamento ansiogênico. Este comportamento foi revertido pelo tratamento com Reboxetina, mas não pelo Metilfenidato. Com relação à atividade locomotora, aqui medida pelo número de travessias entre os ambientes claro e escuro na caixa, os camundongos lesados pelo etanol apresentaram hipoatividade quando comparados aos controles. Este efeito danoso foi revertido tanto pelo Metilfenidato quanto pela Reboxetina.

O teste do *plus-maze* é usado mundialmente e extensamente validado como um teste de ansiedade em animais. O teste baseia-se na aversão natural que roedores apresentam a espaços abertos e elevados (HANDLEY e MITHANI, 1984; PELLOW *et al.*, 1985). Há estudos como o de Carneiro *et al.*, (2005) que mostram que a exposição pré-natal ao etanol tem efeito ansiolítico quando os animais são testados no labirinto em cruz elevado, o *Plus-Maze*. Outros mostram que a exposição crônica ao álcool levam a comportamentos ansiosos, com menor permanência nos braços abertos do labirinto (GETASHEW *et al.*, 2008). Dursun *et al.*, (2006) explica que o comportamento da prole de ratas expostas ao álcool no teste do *plus-maze* podem ser difíceis de interpretar, uma vez que podem refletir ansiedade ou apenas a reação a um ambiente novo. No nosso estudo, os camundongos lesados por etanol no período de neurodesenvolvimento apresentaram um comportamento ansioso, permanecendo menos tempo nos braços abertos quando comparados aos controles. Este efeito deletério foi revertido pela Reboxetina, mas não pelo Metilfenidato. De acordo com nossos achados, Ueno

et al., (2002) mostram que o Metilfenidato não reverteu o comportamento ansioso de modelo animal de déficit de atenção no teste do *Plus-Maze*. Bolanos *et al.*, (2003) também mostraram que animais tratados com Metilfenidato gastavam menos tempo nos braços abertos do *Plus-Maze*. Outros estudos associam ainda a exposição crônica ao metilfenidato com resposta aumentada ao estresse, níveis plasmáticos elevados de corticosterona, além de efeitos depressivos na idade adulta (BOLANOS *et al.*, 2003; CARLEZAN *et al.*, 2003). Não há na literatura relatos sobre o uso da Reboxetina no teste do *Plus-Maze*. Sendo os antidepressivos hoje as drogas de primeira linha no tratamento dos transtornos de ansiedade e tendo em vista que o déficit de atenção se encontra frequentemente acompanhados destes, a Reboxetina pode ser uma alternativa para estes pacientes.

Assim como a ansiedade, a depressão também costuma estar presente em portadores de TDAH. Assim, avaliamos também a existência de depressão e a ação do Metilfenidato e da Reboxetina no nosso modelo. O teste do nado forçado, padronizado por Porsolt *et al.*, (1978) foi o utilizado neste estudo. De acordo com o encontrado na literatura (CARNEIRO *et al.*, 2005), os animais expostos ao etanol tiveram um tempo de imobilidade mais prolongado quando comparados ao grupo controle, indicando um comportamento depressivo. O Metilfenidato não foi capaz de reverter este efeito danoso e, quando aplicado aos animais controles, aumentou o tempo de imobilidade, apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa. Segundo CARLEZAN *et al.*, (2003), roedores expostos ao Metilfenidato no período pré-puberal apresentam aumento do comportamento depressivo e vulnerabilidade aumentada a ambientes estressantes, bem como reatividade diminuída a recompensas naturais. De acordo com o nosso achado, estudos como o de Bolanos *et al.*, (2008) mostram que animais tratados com Metilfenidato apresentam um menor tempo de latência para atingir a imobilidade, o que foi revertido pelo antidepressivo Fluoxetina. A Reboxetina, de maneira surpreendente, apresentou efeito depressor. Estudos prévios (CONNOR *et al.*, 1999; HARKIN *et al.*, 1999; WONG *et al.*, 2000; CRYAN *et al.*, 2002) mostram que a Reboxetina é capaz de diminuir o tempo de imobilidade quando aplicada a animais submetidos a estresse no teste de nado forçado. Pensamos que isto poderia ser devido ao fato de a Reboxetina não ser capaz de reverter o efeito depressivo quando aplicada agudamente, sendo necessário uma exposição crônica pra que o benefício terapêutico aparecesse. Porém, quando aplicamos a Reboxetina por 15 dias seguidos, o resultado não se modificou. Uma das explicações para as discrepâncias encontradas em nosso resultado seria exatamente o fato de nossos animais não terem sido submetidos a estresse antes dos testes.

Em suma, com os resultados acima expostos, observamos que o etanol quando aplicado no período de neurodesenvolvimento causa déficits de atenção e memória, além de hipoatividade em camundongos. Todos estes déficits são revertidos pelo psicoestimulante Metilfenidato, enquanto a Reboxetina mostrou-se útil apenas para mitigar os déficits de atenção. Verificamos ainda que os animais expostos ao etanol apresentam comportamento ansioso e depressivo, sendo a Reboxetina útil na ansiedade, o que não ocorre com o Metilfenidato. Por último, este estudo foi incapaz de demonstrar um efeito antidepressivo da Reboxetina, o que pode ser devido a limitações do teste utilizado.

7 CONCLUSÕES

- A lesão neonatal por etanol causou déficits de atenção e memória em camundongos.
- Os déficits de Atenção foram revertidos pelo Metilfenidato e pela Reboxetina.
- Os déficits de Memória foram revertidos pelo Metilfenidato, mas não pela Reboxetina.
- A lesão neonatal por etanol induziu hipoatividade em camundongos, o que foi revertido pelo Metilfenidato e pela Reboxetina.
- A lesão neonatal por etanol causou ansiedade em camundongos, o que foi revertido pela Reboxetina, mas não pelo Metilfenidato.
- A lesão neonatal por etanol causou depressão em camundongos, o que não foi revertido por Metilfenidato ou Reboxetina.

Concluimos que os camundongos lesados por etanol no período de neurodesenvolvimento apresentam déficits de atenção e memória, sem no entanto apresentarem hiperatividade. Assim, podem ser utilizados como modelo animal de déficit de atenção sem hiperatividade. Ainda, que embora o Metilfenidato tenha se mostrado superior neste estudo, continuando a ser a droga de primeira escolha, medicações não-psicoestimulantes como a Reboxetina podem ser uma alternativa para pacientes com reposta pobre a psicoestimulantes ou que apresentem comorbidade como o transtorno de ansiedade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E. L. **Fetal alcohol syndrome**. New York, US: CRC Press, 1981.

ABRAMOWICZ, M. Sudden death in children treated with a tricyclic antidepressant. **Med Lett Drugs Ther.**, v.32, p.53, 1991.

ADLER, L. E.; OLNEY, A.; WALDO, M.; HARRIS, J. G.; GRIFFITH, J.; STEVENS, K.; FLACH, K.; NAGAMOTO, H.; BICKFORD, P.; LEONARD, S.; FREEDMAN, R. Schizophrenia, sensory gating, and nicotinic receptors. **Schizophrenia Bulletin**, v.24, p.189-202, 1998.

ALEX, K. D.; PEHEK, E. A. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. **Pharmacology & Therapeutics**, v.113, p.296-320, 2007.

ALEXANDER, G. E.; DELONG M. R., STRICK PL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.9, p.357–381, 1986.

AMARA, S.G.; SONNERS, M.S. Neurotransmitter transporters as molecular targets for addictive drugs. **Drug Alcohol Depend.**, v.51, p.87-96, 1998.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION – APA. Attention-deficit and disruptive behaviour disorders. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR**. 4. ed. Washington DC: American Psychiatric Association, 2000

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION – APA. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 4. ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.

ARCHER, T.; FREDRIKSSON, A.; SUNDSTRÖM, E.; LUTHMAN, J.; LEWANDER, T.; SÖDERBERG, U.; JONSSON, G. Prenatal methylazoxymethanol treatment potentiates D-amphetamine - and methylphenidate-induced motor activity in male and female rats. **Pharmacology and Toxicology**, v.63, p.233–239, 1988.

ARCHIBALD, S.L.; FENNEMA-NOTESTINE, C.; GAMST, A.; RILEY, E.P.; MATTSON, S.N.; JERNIGAN, T.L. Brain dysmorphology in individuals with severe prenatal alcohol exposure. **Dev. Med. Child Neurol.**, v.43, p. 148-154, 2001.

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

ARNSTEN, A.F.T.; MING-LI, B. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences of prefrontal cortical functions. **Society of Biological Psychiatry**, v.57, p.1377-1384, 2005.

ARNSTEN, A.F.T.; STEERE, J.C.; HUNT, R.D. The contribution of alpha-2-noradrenergic mechanisms to prefrontal cortical cognitive function: Potential significance to attention deficit hyperactivity disorder. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.53, p.448-455, 1996.

AXELROD, J. Regulation of the neurotransmitter norepinephrine. *In*: SCMITT, F.O.; WORDEN, F.G. (Ed.). **The Neurosciences**: third Study Program. Cambridge: MIT Press, 1974. p.863-876.

BADDELEY A. The concept of working memory: a view of its current state and probable future development. **Cognition**, v.10, suppl. 3, p.17–23, 1981.

BALLONE, G.J.; MOURA, E.C. Antidepressivos atípicos. **PsiquWeb**, 2008. Disponível em: <www.psiqweb.med.br>. Acesso em: 20 dez. 2008.

BARKLEY, R.A. **ADHD and the nature of self-control**. New York: Guilford. 1997.

BARKLEY, R.A. **Attention-deficit hyperactivity disorder**: a handbook for diagnosis and treatment. 3. ed. New York: Gilford Press, 2006.

BARKLEY, R.A. Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. **Psychol. Bull.**, v.121, n.1, p.65-94, 1997.

BELMGROVE, M.A.; DOMSCHKE, K.; HAWI, Z.; KIRLEY, A.; MULLINS, C.; ROBERTSON, I.H.; GILL, M. The methionine allele of the COMT polymorphism impairs prefrontal cognition in children and adolescents with ADHD. **Experimental Brain Research**, v.163, p.352–360, 2005.

BERRIDGE CW, ATALNAKER TA. Relationship between low-dose amphetamine-induced arousal and extracellular norepinephrine and dopamine levels within prefrontal cortex. **Synapse**, v.46, p.140-149, 2002.

BIEDERMAN, J.; BALDESSARINI, R.J.; WRIGHT, V.; KNEE, D.; HARMATZ, J.S.; GOLDBLATT, A. A double-blind placebo controlled study of desipramine in the treatment

ADD: II. Serum drug levels and cardiovascular findings. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, v.28, n.6, p.903-911, 1989.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.; KEENAN, K.; BENJAMIN, J.; KRIFCHER, B.; MOORE, C. *et al.* Further evidence for family-genetic risk factors in attention deficit hyperactivity disorder. Patterns of comorbidity in probands and relatives psychiatrically and pediatrically referred samples. **Archives of General Psychiatry**, v.49, p.728-738, 1992.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.V.; SPENCER, T.; WILENS, T.; NORMAN, D.; LAPEY, K.A.; MICK, E.; LEHMAN, B.K.; DOYLE, A. Patterns of psychiatric comorbidity, cognition, and psychosocial functioning in adults with attention deficit hyperactivity disorder. **Am. J. Psychiatry**, v.150, p.1792-1798, 1993.

BIEDERMAN, J.; KWON, A.; ALEARDI, M.; CHOUINARD, V.A.; MARINO, T.; COLE, H.; MICK, E.; FARAONE, S.V. Absence of gender effects on attention deficit hyperactivity disorder: findings in nonreferred subjects. **Am. J. Psychiatry**, v.162, n.6, p.1083-1089, 2005.

BIEDERMAN, J.; NEWCORN, J.; SPRICH, S. Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorders. **American Journal of Psychiatry**, v.148, p.564-577, 1991.

BIEDERMAN, J.; PETTY, C.R.; WILENS, T.E.; FRAIRE, M.G.; PURCELL, C.A.; MICK, E.; MONUTEAUX, M.C.; FARAONE, S.V. Familial risk analyses of attention deficit hyperactivity. Disorder and Substance Use Disorders. **Am. J. Psychiatry**, v.165, p.107-115, 2008.

BIEDERMAN, J.; SPENCER, T. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. **Biol. Psychiatry**, v.46, n.9, p.1234-1242, 1999.

BIEDERMAN, J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. **Biol. Psychiatry**, v.57, n.11, p.1215-1220, 2005.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.; MILBERGER, S.; GUYE, J.; MICK, E.; CHEN, L.; MENNIN, D.; MARRS, A.; OUELLETTE, C.; MOORE, P.; SPENCER, T.; NORMAN, D.; WILENS, T.; KRAUS, I.; PERRIN, J. A prospective 4-year follow-up study of attention-deficit hyperactivity and related disorders. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.53, n.5, p.437-446, 1996.

BOBB, A.J.; CASTELLANOS, F.X.; ADDINGTON, A.M.; RAPOPORT, J.L. Molecular genetic studies of ADHD: 1991 to 2004. **American Journal of Medical Genetics B Neuropsychiatric Genetics**, v.132, p.109-125, 2005.

BOKSA, P.; EL-KHODOR, B.F. Birth insult interacts with stress at adulthood to alter dopaminergic function in animal models: possible implications for schizophrenia and other disorders. **Neuroscience and Behavioural Reviews**, v.27, p.91-101, 2003.

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

BRADLEY, W. The behavior of children receiving Bensedrine. **American Journal of Psychiatry**, v.94, p.577-585, 1937.

BROADHURST, P.L. Determinants of emotionality in the rat: I situational factors. **Brit. J. Psychol.**, v.48, p.1-12, 1957.

BUSCH, B.; BIEDERMAN, J.; COHEN, L.G.; SAYER, J.M.; MONUTEAUX, M.C.; MICK, E.; ZALLEN, B.; FARAONE, S.V: Correlates of ADHD among children in pediatric and psychiatric clinics. **Psychiatr. Serv.**, v.53, n.9, p.1103-1111, 2002.

BYMASTER, F.P.; KATNER, J.S.; NELSON, D.L.; HEMRICK-LUECKE, S.K.; THRELKELD, P.G.; HEILIGENSTEIN, J.H.; MORIN, S.M.; GEHLERT, D.R.; PERRY, K.W. Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. **Neuropsychopharmacology**, v.27, n.5, p.699-711, 2002.

BYRNES, M.L.; REYNOLDS, J.; BRIEN, J.F. Effect of prenatal ethanol exposure during the brain growth spurt in guinea pig. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 23, p. 355-364, 2001.

CAHIL, L.; McGAUGH, J.L. Amygdaloid complex lesions differentially affect retention of tasks using appetitive and aversive reinforcement. **Behav. Neurosci.**, v. 104, p. 532-543, 1990.

CALLAHAN, P.M.; DE LA GARZA 2ND, R.; CUNNINGHAM, K.A. Mediation of the discriminative stimulus properties of cocaine by mesocorticolimbic dopamine systems. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v.57, p.601-607, 1997.

CARDINAL, R.N.; WINSTANLEY, C.A.; ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J. Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. **Annals of New York Academy of Science**. v.1021, p.33-50, 2004.

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

CARNEIRO, L.M.V.; DIÓGENES, J.P.L.; VASCONCELOS, S.M.M.; ARAGAO, G.F.; NORONHA, E.C.; GOMES, P.B.; VIANA, G.S.B. Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol. **Neurotoxicology and Teratology**, v.27, p.585-592, 2005.

CARREY, N.; MACMASTER, F.P.; FOGEL, J.; SPARKES, S.; WASCHBUSCH, D.; SULLIVAN, S.; SCHMIDT, M. Metabolite changes resulting from treatment in children with ADHD: a 1H-MRS study. **Clin. Neuropharmacol.**, v.26, n.4, p.218-221, 2003.

CARTER, H.S.; WATSON, W.A. IV pentazocine/methylphenidate abuse--the clinical toxicity of another Ts and blues combination. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v.32, n.5, p.541-547, 1994.

CASAT, C.D.; PLEASANTS, D.Z.; SCHROEDER, D.H.; PARLER, D.W. Bupropion in children with attention deficit disorder. **Psychopharmacol. Bull.**, v.25, p.198-201, 1989.

CASAT, C.D.; PLEASANTS, D.Z.; VAN WYCK FLEET, J. A doubleblind trial of bupropion in children with attention deficit disorder. **Psychopharmacol. Bull.**, v.23, p.120-122, 1987.

CASTELLANOS, F.X.; ELIA, J.; KRUESI, M.J.; MARSH, W.L.; GULOTTA, C.S.; POTTER, W.Z.; RITCHIE, G.F.; HAMBURGER, S.D.; RAPOPORT, J.L. Cerebrospinal fluid homovanillic acid predicts behavioral response to stimulants in 45 boys with attention deficit/hyperactivity disorder. **Neuropsychopharmacology**, v.14, n.2, p.125-137, 1996.

CASTELLANOS, F.X.; GIEDD, J.N.; MARSH, W.L.; HAMBURGER, S.D.; VALTUZIS, A.C.; DICKSTEIN, D.P.; SARFATTI, S.E.; VAUSS, Y.C.; SNELL, J.W.; LANGE, N.; KAYSEN, D.; KRAIN, A.L.; RITCHIE, G.F.; RAJAPAKSE, J.C.; RAPOPORT, J.L. Quantitative brain magnetic resonance imaging in attention-deficit hyperactivity disorder. **Archives of General Psychiatry**, v.53, p.607-616, 1996.

CHOONG, K.C.; SHEN, K.Y. Methylphenidate restores ventro tegmental area dopamine neuron activity in prenatal ethanol-exposed rats by augmenting dopamine neurotransmission. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 309, n.2, p. 444-451, 2004.

CHRISTMAN, A.K.; FERMO, J.D.; MARKOWITZ, J.S. Atomoxetine, a novel treatment for attention-deficit-hyperactivity disorder. **Pharmacotherapy**, v.24, n.8, p.1020-1036, 2004.

COLES, C.D.; PLATZMAN, K.A.; RASKIND-HOOD, C.L.; BROWN, R.T.; FALEK, A.; SMITH, I.E. A comparison of children affected by prenatal alcohol exposure and attention deficit, hyperactivity disorder. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.21, n.1, p.150-161, 1997.

CONNERS, C.; CASAT, C.; GUALTIERI, C.; WELLER, E.; READER, M.; REISS, A. *et al.* Bupropion hydrochloride in attention deficit disorder with hyperactivity. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry**, v.35, p.1314–1321, 1996.

CONNOR, T.J.; KELLIHER, P.; HARKIN, A.; KELLY, J.P.; LEONARD, B.E. Reboxetine attenuates forced swim test-induced behavioural and neurochemical alterations in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 379, p. 125–133, 1999.

CRYAN, J.F.; PAGE, M.E.; LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 436, p. 197–205, 2002.

DAVIDS, E.; ZHANG, K.; TARAZI, F.I.; BALDESSARINI, R.J. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioural Brain Research**, v.4, p.1-21, 2003.

DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **Trends in Neurosci.**, v.17, p. 208-214, 1994.

DELATOUR, B.; GISQUET-VERRIER, P. Prelimbic cortex specific lesions disrupt delayed-variable response tasks in the rat. **Behav. Neurosci.**, v. 110, p. 1282-1298, 1996.

DEMBER, W.N.; FOWLER, H. Spontaneous alternation after free and forced trials. **Can. J. Psychol.**, v. 13, p. 151-154, 1959.

DENCKLA, M.B. A theory and model of executive function: a neuropsychological perspective. In: LYON, G.R.; KRASNEGOR, N.A. (Ed.). Attention, memory and executive function. Baltimore: Paul H. Brookes, 1996. cap. 15, p.263-278.

DENOBLE, V.J.; REPETTI, S.J.; GELPKE, L.W.; WOOD, L.M.; KEIM, K.L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v.24, p.1123-1128, 1986.

DIAMOND, I.; GORDON, A.S. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. **Physiol. Rev.**, v.77, p.1-20, 1997.

DIVAC, I.; WIKMARK, R.G.E.; GADE, A. Spontaneous alternation in rats with lesions of frontal lobes: an extension of the frontal lobe syndrome. **Physiol. Psychol.**, v. 3, p. 39-42, 1975.

DRAGO, J.; GERFEN, C.R.; WESTPHAL, H.; STEINE, H. D1 dopamine receptor-deficient mouse: cocaine induced regulation of immediate-early gene and substance P expression in the stratum. **Neuroscience**, v.74, p.813-823, 1996.

DRUSE, M.J.; TAJUDDIN, N.; KUO, A.; CONNERTY, M. Effects of in utero ethanol exposure on the developing dopaminergic system in rats. **J. Neurosci. Res.**, v.27, n.2, p.233-240, 1990.

DUDCHENKO, P.A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.28, n.7, p.699-709, 2004. Special Issue.

DUNCAN, J.; OWEN, A.M. Common regions of the human frontal lobe recruited by diverse cognitive demands. **Trends Neurosci.**, v.23, p.475-483, 2000.

EICHENBAUM, H.; COHEN, N.J. **From conditioning to conscious recollection: memory systems of the brain.** Toronto: Oxford University Press, 2001.

EL-FADDAGH, M.; LAUCHT, M.; MARAS, A.; VOHRINGER, L.; SHMIDT, M.H. Association of dopamine D4 receptor (DRD4) gene with attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a high-risk community sample: a longitudinal study from birth to 11 years of age. **Journal of Neural Transmission**, v.111, p.883-889, 2004.

ERNHART, C.B.; SOKOL, R.J.; MARTIER, S.; NADLER, D.; AGER, J.W.; WOLF, A. Alcohol teratogenicity in the human: a detailed assessment of specificity, critical period, and threshold, **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.156, p.33-39, 1987.

FARAONE, S.; BIEDERMAN, J.; MONUTEAUX, M. Toward guidelines for pedigree selection in genetic studies of attention deficit hyperactivity disorder. **Genetic Epidemiology**, v.18, p.1-16, 2000.

FARAONE, S.V.; BIEDERMAN, J.; MENNIN, D.; RUSSELL, R.; TSUANG, M.T. Familial subtypes of attention deficit hyperactivity disorder: a 4-year follow-up study of children from antisocial-ADHD families. **J. Child. Psychol. Psychiatry**, v.39, n.7, p.1045-1053, 1998.

FARAONE, S.V.; BIEDERMAN, A.; CHEN, W.J.; MILBERGER, S.; WARBURTON, R.; TSUANG, M.T. Genetic heterogeneity in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): gender, psychiatric comorbidity, and maternal ADHD. **J. Abnorm. Psychol.**, v.104, n.2, p.334-345, 1995.

FARAONE, S.V.; MONUTEAUX, M.C.; BIEDERMAN, J.; COHAN, S.L.; MICK, E. Does parental ADHD bias maternal reports of ADHD symptoms in children? **J. Consult. Clin. Psychol.**, v.71, n.1, p.168-175, 2003.

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

FILIPEK, P.A.; SEMRUD-CLIKEMAN, M.; STEINGARD, R.J.; RENSHAW, P.F.; KENNEDY, D.N.; BIEDERMAN, J. Volumetric MRI analysis comparing subjects having attention-deficit hyperactivity disorder with normal controls. **Neurology**, v.48, n.3, p.589-601, 1997.

FLECKENSTEIN, A.E.; GIBB, J.W.; HANSON, G.R. Differential effects of stimulants on monoaminergic transporters: pharmacological consequences and implications for neurotoxicity. **Eur. J. Pharmacol.**, v.406, n.1, p.1-13, 2000.

FREDRIKSSON, A.; ARCHER, T. Neurobehavioural deficits associated with apoptotic neurodegeneration and vulnerability for ADHD. **Neurotox. Res.**, v.6, n.6, p.435-456, 2004.

FRICK, P.J.; KUPER, K.; SILVERTHORN, P.; COTTER, M. Antisocial behavior, somatization, and sensation-seeking behavior in mothers of clinic-referred children. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, v.34, n.6, p.805-812, 1995.

GAINETDINOV, R.R.; JONES, S.R.; CARON, M.G. Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice. **Biol. Psychiatr.**, v.46, p.303-311, 1999.

GAINETDINOV, R.R.; SOTNIKOVA, T.D.; CARON, M.G. Monoamine transporter pharmacology and mutant mice. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.23, p.367-373, 2002.

GATLEY, S.J.; PAN, D.; CHEN, R.; CHATURVEDI, G.; DING, Y.S. Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. **Life Sci.**, v.58, p.231-239, 1996.

GIBSON, M.A.; BUTTERS, N.S.; REYNOLDS, J.N.; BRIEN, J.F. Effects of chronic prenatal ethanol exposure on locomotor activity, and hippocampal weight, neurons, and nitric oxide synthase activity of the young postnatal guinea pig. **Neurotoxicol Teratol.**, v.22, p.183-192, 2000.

GETACHEW, B.; HAUSER, S.R.; TAYLOR, R.E.; TIZABI, Y. Desipramine blocks alcohol-induced anxiety - and depressive-like behaviors in two rat strains. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.91, n.1, p.97-103, 2008.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Regional and cellular fractionation of working memory. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.93, n.24, p.13473-13480, 1996.

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**, v. 294, p.1024-1030, 2001.

GUERRI, C. Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. **Neurotox Res.**, v.4, p.327-335, 2002.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 327, p.1-5, 1984.

HAMARMAN, S.; FOSSELLA, J.; ULGER, C.; BRIMACOMBE, M.; DERMODY, J. Dopamine receptor 4 (DRD4) 7-repeat allele predicts methyl-phenidate dose response in children with attention deficit hyperactivity disorder: a pharmacogenic study. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v.14, p.564-574, 2004.

HANNIGAN, J.H.; RANDALL, S. Behavioral pharmacology in animals exposed prenatally to alcohol. In: _____. **Fetal alcohol syndrome: from mechanism to prevention**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p.191-213.

HARKIN, A.; KELLY, J.P.; MCNAMARA, M.; CONNOR, T.J.; DREDGE, K.; REDMOND, A.; LEONARD, B.E. Activity and onset of action of reboxetine and effect of combination with sertraline in an animal model of depression. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 364, p. 123-132, 1999.

HAUSKNECHT, K.A.; ACHESON, A.; FARRAR, A.M.; KIERES, A.K.; SHEN, R.Y.; RICHARDS, J.B. *et al.* Prenatal alcohol exposure causes attention deficits in male rats. **Behav. Neurosci.**, v.119, p.302-310, 2005.

HAWI, Z.; DRING, M.; KIRLEY, A.; FOLEY, D.; KENT, L.; CRADDOCK, N.; ASHERSON, P.; CURRAN, S.; GOULD, A.; RICHARDS, S.; LAWSON, D.; PAY, H.; TURIC, D.; LANGLEY, K.; OWEN, M.; O'DONOVAN, M.; THAPAR, A.; FITZGERALD, M.; GILL, M. Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT(1B) receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample. **Mol. Psychiatry**, v.7, p.718-725.

HECHTMAN, L.; WEISS, G. Controlled prospective fifteen year follow-up of hyperactives as adults: non-medical drug and alcohol use and anti-social behaviour. **Can. J. Psychiatry**, v.31, p.557-567, 1986.

HESS, E.J.; COLLINS, K.A.; WILSON, M.C. Mouse model of hyperkinesis implicates SNAP-25 in behavioral regulation. **J. Neurosci.**, v.16, p.3104-3111, 1996.

HESSLINGER, B.; TEBARTZ VAN ELST, L.; THIEL, T.; HAEGELE, K.; HENNIG, J.; EBERT, D. Frontoorbital volume reductions in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder. **Neurosci.Lett.**, v.328, p.319–321, 2002.

HILL, D.E.; YEO, R.A.; CAMPBELL, R.A.; HART, B.; VIGIL, J.; BROOKS, W. Magnetic resonance imaging correlates of attention-deficit/hyperactivity disorder in children, **Neuropsychology**, v.17, p.496–506, 2003.

IKONOMIDOU, C.; BITTIGAU, C.; ISHIMARU, M.J.; WOZNRAC, D.F.; KOCH, C.; GENZ, K.; PRICE, M.T.; HORSTER, F.; FELDETHOFF-MUESER, U.; TENKOVA, T.I.; DIKRANIAN, K.; OLNEY, J.W. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. **Biochem. Pharmacol.**, v.62, p.401-405, 2001.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M. B. C.; MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. **Behav. and Neural. Biol.**, v. 58, p. 16-26, 1992.

IZQUIERDO, I.; BIANCHIN, M.; BUENO E SILVA, M.; ZANNATA, M. S.; WALZ, R.; DA SILVA, R. C.; RUSCHEL, A.; PACZKO, N.; MEDINA, J. H. CNQX infused into rat hippocampus or amygdala disrupts the expression of memory of two different tasks. **Behav. Neural. Biol.**, v. 59, p. 1-4, 1993.

JOHNSON, C.R.; OLTON, D.S.; GAGE III, F.H.; JENKO, P.G. Damage to hippocampus and hippocampal connections: effects on DRL and on spontaneous alternation. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 91, p. 508-522, 1977.

JONES, M.D.; WILLIAMS, M.E.; HESS, E.J. Abnormal presynaptic catecholamine regulation in a hyperactive SNAP-25-deficient mouse mutant. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.68, p.669–676, 2001.

KIRLEY, A.; HAWI, Z.; DALY, G.; MCCARRON, M.; MULLINS, C.; MILLAR, N.; WALDMAN, I.; FITZGERALD, M.; GILL, M. Dopaminergic system genes in ADHD: toward a biological hypothesis. **Neuropsychopharmacology**, v.27, n.4, p.607-619, 2002.

KLIMEC, V.; SCHENCK, J. E.; HAN, H.; STOCKMEIER, C.A.; ORDWAY, G.A.; Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: a postmortem study. **Biological Psychiatry**, v.52, p.740-748, 2002.

KORNETSKY, C. The psychopharmacology of the immature organism. **Psychopharmacologia**, v.17, p.105-136, 1970.

KOTIMAA, A.J.; MOILANEN, I.; TAANILA, A.; EBELING, H.; SMALLEY, S.L.; MCGOUGH, G.; HARTIKAINEN, A.L.; JARVELIN, M.R. Maternal smoking and hyperactivity in 8-year-old children. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, v.42, p.826-833, 2003.

KRAJNE, D.; WELMINGER, T.A.; NEFF, N.H.; HADJICONSTANTINO, M. Neonatal hypoxia: early neurotransmitter responses and the consequences of treatment with GM1 ganglioside. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.271, p.1299-1305, 1994.

KRAUSE, K.H.; DRESEL, S.H.; KRAUSE, J.; KUNG, H.F.; TATSCH, K. Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography, **Neuroscience Letters**, v.285, p.107-110, 2000.

KRAUSE, K.H.; DRESEL, S.H.; KRAUSE, J.; KUNG, H.F.; TATSCH, K.; ACKENHEIL, M. Stimulant-like action of nicotine on striatal dopamine transporter in the brain of adults with attention deficit hyperactivity disorder. **Int. J. Neuropsychopharmacology**, v.5, p.111-113, 2002.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. Concomitant characterization of behavioral and striatal neurotransmitter response to amphetamine using in vivo microdialysis. **J. Neurosci.**, v.9, n.6, p.2051-2065, 1989.

LACHMAN, H.M.; PAPOLOS, D.F.; SAITO, T.; YU, Y.M.; SZUMLANSKI, C.L.; WEINSHILBOUM, R.M. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. **Pharmacogenetics**, v.6, p.243-250, 1996.

LAHEY, B.B.; APPLGATE, B.; MCBURNETT, K. *et al.* DSM IV field trials for attention-deficit hyperactivity disorder in children and adolescents. **American Journal of Psychiatry**, v.151, p.1673-1685, 1994.

LEIBSON, C.L.; KATUSIC, S.K.; BARBARESI, W.J.; RANSOM, J.; O'BRIEN, P.C. Use and costs of medical care for children and adolescents with and without attention deficit/hyperactivity disorder. **JAMA**, v.285, n.1, p.60-66, 2001.

LEVY, F.; SWANSON, J.M. Timing, space and ADHD: the dopamine theory revisited. **Aust NZ J. Psychiatry**, v.35, p.504-511, 2001.

LOPEZ, R.E. Hiperactivity in twins. **Can. Pshychiatr. Assoc. J.**, v.10, p.421-426, 1965.

LURIA, A.R. The frontal lobes and the regulation of behavior. In: _____. **Psychophysiology of the frontal lobes**. NovaYork: Academic Press, 1973. cap. 1, p. 3-26.

MADRAS, B. Brains imaging of the dopamine transporter in ADHD. **Behav. Brain Res.**, v.130, p.57-63, 2002.

MALER, L.; FIBIGER, H.C.; MCGEER, P.L. Demonstration of the nigrostriatal projection by silver staining after nigral injections of 6-hydroxydopamine. **Experimental Neurology**, v.40, n.2, p.505-515, 1973.

MANNUZZA, S.; GITTELMAN, R.; KLEIN, R.; BONAGURA, N.; MALLOY, P.; GIAMPINO, T.L.; ADDALLI, K.A. Hyperactive boys almost grown up, V: replication of psychiatric status. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.48, p.77-83, 1991.

MATTSON, S.N.; RILEY, E.P. A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.22, n.2, p.279-294, 1998.

MATTSON, S.N.; SCHOENFELD, A.M.; RILEY, E.P. Teratogenic effects of alcohol on brain and behavior. **Alcohol Res. Health**, v.25, p.185-191, 2001.

MICK, E.; BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.V.; SAYER, J.; KLEINMAN, S. Case-control study of attention-deficit hyperactivity disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatr.**, v.41, p.378-385, 2002.

MICKLEY, G.A.; REMMERS-ROEBER, D.R.; CROUSE, C.; PELUSO, R. Ketamine blocks a taste recognition memory in fetal rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.67, p.575-580, 2000.

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

MILLSTEIN, R.B.; WILENS, T.E.; BIEDERMAN, J. *et al.* Presenting ADHD symptoms and subtypes in clinically referred adults with ADHD. **Journal of Attention Disorders**, v.2, p.159-166, 1997.

MOGHADDAN, B.; ADAMS, B.; VERNA, A.; DALY, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **J. Neurosci.**, v.17, p.2921-2927, 1997.

NAYLOR, J.C.; SIMSON, P.E.; GIBSON, B.; SCHNEIDER, A.M.; WILKINS, E.; FIRESTONE, A.; CHOY, M. Ethanol inhibits spontaneous activity of central nucleus of the amygdala neurons but does not impair retention in the passive-avoidance task. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.25, n.11, p. 1683-1688, 2001.

NEDEGAARD, S.; BOLAM, J.P.; GREENFIELD, S.A. Facilitation of a dendritic calcium conductance by 5-hydroxytryptamine in the substantia nigra. **Nature**, London, v.333, p.174-177, 1988.

NEVE, K.A.; NEVE, R.L. (Ed.). **The dopamine receptors**. Totowa, NJ: Humana press, 1997.

OESTERHELD, J.R.; KOFOED, L.; TERVO, R.; FOGAS, B.; WILSON, A.; FIECHTNER, H. Effectiveness of methylphenidate in native american children with fetal alcohol syndrome and attention-deficit /hyperactivity disorder: a controlled pitot study. **Journal of child and adolescent psychopharmacology**, v. 8, p. 39-48, 1998.

O'NEILL, M.; HERON-MAXWELL, C.; SHAW, G. 5-HT2 receptor antagonism reduces hyperactivity induced by amphetamine, cocaine, and MK-801 but not D1 agonist C-APB. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.63, p.237-243, 1999.

OLNEY, J.W.; FARBER, N.B.; WOZNIAK, D.F.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V.; IKONOMIDOU, C. Enviromental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **Environ. Health Prospect.**, v.108, suppl. 3, p.383-388, 2000.

OTKA, J.E.; MERCADANTE, M.T.; SCAHILL, L.; LECKMAN, J.F. Reboxetine as a potentially effective treatment for attention deficit hyperactivity disorder (carta ao editor). **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v.11, n.2, p.203–204, 2001.

PALOMO, T.; BENINGER, R.J.; KOSTRZEWA, R.M.; ARCHER, T. Brain sites of movement disorder: genetic and environmental agents in neurodevelopmental perturbations. **Neurotox Res.**, v.5, n.1-2, p.1-26, 2003.

PASSLER, M.; ISAAC, W.; HYND, G.W. Neuropsychological behavior attributed to frontal lobe functioning in children. **Dev. Neuropsychol.**, p.349-370, 1985.

PENNINGTON, B.F.; GROISSIER, D.; WELSH, M.C. Contrasting cognitive deficits in attention deficit hyperactivity disorder versus reasing disability. **Dev. Psychol.**, v.23, p.511-523, 1993.

PENNINGTON, B.F. The working memory function of the prefrontal cortices. *In*: HAITH, M.M.; BENSON, J.B.; ROBERTS, R.J.; PENNINGTON, B.F. (Ed.). **The development of future oriented processes**. Chicago: The University of Chicago Press, 1994.

PLISZKA, S.R.; MCCRACKEN, J.T.; MAAS, J.W. Catecholamines in attention-deficit hyperactivity disorder: current perspectives. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, v.35, n.3, p.264-272, 1996.

POMERLAU, O.F.; DOWNEY, K.K.; STELSON, F.W.; POMERLAU, C.S. Cigarette smoking in adult patients diagnosed with attention deficit hyperactivity disorder. **J. Subst. Abuse**, v.7, p.373-378, 1995.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur. J. Pharmacol.**, v.47, p.379-391, 1978.

POSNER, M.I.; PETERSEN, S.E. The attention system of the human brain. **Annu Rev Neurosci.**, v.13, p.25-42, 1990.

RABER, J.; MEHTA, P.P.; KREIFELDT, M.; PARSONS, L.H.; WEISS, F.; BLOOM, F.E. *et al.* Coloboma hyperactive mutant mice exhibit regional and transmitter-specific deficits in neurotransmission. **J. Neurochem.**, v.68, p.176-186, 1997.

RAMUSSEN, E.R.; NEUMAN, R.J.; HEATH, A.C.; LEVY, F.; HAY, D.A.; TODD, R.D. Replication of the latent class structure of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) subtypes in a sample of Australian twins. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v.43, p.1018-1028, 2002.

RAPPORT, M.D.; CHUNG, K.M.; SHORE, G.; DENNEY, C.B.; ISAACS, P. Upgrading the science and technology of assessment and diagnosis: laboratory and clinic-based assessment of children with ADHD. **J. Clin. Child Psychol.**, v.29, n.4, p.:555-568, 2000.

RATHBUN, W.; DRUSE, M.J. Dopamine, serotonin and acid metabolites in brain regions from the developing offspring of ethanol-treated rats. **J. Neurochem.**, v.44, p.57-62, 1985.

RATNER, S.; LAOR, N.; BRONSTEIN, Y.; WEIZMAN, A.; TOREN, P. Six-week open-label reboxetine treatment in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, v.44, n.5, p.428-433, 2005.

RETZ, W.; THOME, J.; BLOCHER, D.; BAADER, M.; ROSLER, M. Association of attention deficit hyperactivity disorder-related psychopathology and personality traits with the serotonin transporter promoter region polymorphism. **Neurosci. Lett.**, v.319, n.3, p.133-136, 2002.

RILEY, E.P.; MCGEE, C.L.; SOWELL, E.R. Teratogenic effects of alcohol: a decade of brain imaging. **Am. J. Med. Genet.**, v.127c, p.35-41, 2004.

ROBERTSON, B.A.; CLEMENTS, K.M.; WAINWRIGTH, P.E. The working memory capabilities of the spontaneously hypertensive rat. **Physiology & Behavior**, v.94, p.481–486, 2008.

ROHDE, L.A.; BARBOSA, G.; POLANCZYK, G.; EIZIRIK, M.; RAMUSSEN, E.R.; NEUMAN, R.J. *et al.* Factor and latent class analysis of DSM-IVADHD symptoms in a school sample of Brazilian adolescents. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**. v.40, p.711-718, 2001.

ROMINE, C.B.; REYNOLDS, C.R. Sequential memory: a developmental perspective on its relation to frontal lobe functioning. **Neuropsychol. Rev.**, v.14, p.1, 2004.

ROWLAND, A.S.; UMBACH, D.M.; CATOE, K.E.; STALLONE, L.; LONG, S.; RABINER, D.; NAFTEL, A.J.; PANKE, D.; FAULK, R.; SANDLER, D.P. Studying the epidemiology of attention-deficit hyperactivity disorder: screening method and pilot results. **Can. J. Psychiatry**, v.46, n.10, p.931-940, 2001.

RUSSEL, V. Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal of Neuroscience Methods**, v.161, p.185–198, 2007.

RUSSELL, V.; ALLIE, S.; WIGGINS, T. Increased noradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. **Behav. Brain Res.**, v.117, p.69–74, 2000.

RUSSELL V, DE VILLIERS A, SAGVOLDEN T, LAMM M, TALJAARD J. Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. **Brain Res.**, Apr 10, v.676, n.2, p.343-351, 1995.

SANDOVAL, V.; RIDDLE, E.L.; HANSON, G.R.; FLECKENSTEIN, A.E. Methylphenidate redistributes vesicular monoamine transporter-2: role of dopamine receptors. **J. Neurosci.**, v.22, n.19, p. 8705-8710, 2002.

SCHACHAR, R.; WACHSMUTH, R. Hyperactivity and parental psychopathology. **J. Child Psychol. Psychiatry.**, v.31, n.3, p.381-392, 1990.

SCHERMAN, D.K.; MCGUE, M.K.; IACOMO, W.G. Twin concordance for attention deficit hyperactivity disorder: a comparison of teachers' and mothers' reports. **Am. J. Psychiatry.**, v.154, p.532:535, 1997.

SEIDMAN, L.J.; BIEDERMAN, J.; MONUTEAUX, M.C.; WEBER, W.; FARAONE, S.V. Neuropsychological functioning in nonreferred siblings of children with attention deficit/hyperactivity disorder. **J. Abnorm. Psychol.**, v.109, p.252-265, 2000.

SERGEANT, J.A.; GEURTS, H.; OOSTERLAAN, J. How specific is a deficit of executive functioning for attention-deficit/hyperactivity disorder? **Behav. Brain Res.**, v.130, p.3-28, 2002.

SHAYWITZ, B.A.; YAGER, R.D.; KLOPPER, J.H. Selective brain dopamine depletion in developing rats: An experimental model of minimal brain dysfunction. **Science**, v.191, p.305–308, 1976.

SHEKIM, W.O.; ASARNOW, R.F.; HESS, E.; ZAUCHA, K.; WHEELER, N. A clinical and demographic profile of a sample of adults with attention deficit hyperactivity disorder, residual state. **Compr. Psychiatry**, v.31, p.416–425, 1990.

SHEN, R.Y.; CHOONG, K.C. Different Adaptations in Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons in Control and Ethanol Exposed Rats After Methylphenidate Treatment **Biol. Psychiatry**, v.59, p.635–642, 2006.

SHEN, R.Y.; HANNIGAN, J.H.; CHIODO, L.A. The effects of chronic amphetamine treatment on prenatal ethanol-induced changes in dopamine receptor function: electrophysiological findings. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.274, p.1054–1060, 1995.

SHETTY, A.K.; BURROWS, R.C.; PHILLIPS, D.E. Alterations in neuronal development in the substantia nigra pars compacta following in utero ethanol exposure: immunohistochemical and Golgi studies. **Neuroscience**, v.52, p.311–322, 1993.

SIESJO, B.K. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. **Cereb. Blood Metab.**, v. 1, p. 155-185, 1981.

SMITH, A.; TAYLOR, E.; BRAMMER, M.; TOONE, B.; RUBIA, K. Task-specific hypoactivation in prefrontal and temporoparietal brain regions during motor inhibition and task switching in medication-naïve children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. **Am. J. Psychiatry**, v.163, p.1044-1051, 2006.

SOLANTO, M.V. Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. **Behav. Brain Res.**, 10, v.130, n.1-2, p.65-71, 2002.

SOLANTO, M. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. **Behav. Brain Res.**, v.94, p.127-152, 1998.

SONUGA-BARKE, E.J.; TAYLOR, E.; SEMBI, S.; SMITH, C. Hyperactivity and delay aversion I. The effect of delay on choice. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, .33, p.387-398, 1992.

SPENCER, T.; BIEDERMAN, J.; COFFEY, B.; GELLER, D.; CRAWFORD, M.; BEARMAN, S.K.; TARAZI, R.; FARAONE, S.V. A Double-blind comparison of desipramine and placebo in children and adolescents with chronic tic disorder and comorbid attention-deficit/hyperactivity disorder. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.58, p.649-656, 2002.

SPRICH, S.; BIEDERMAN, J.; CRAWFORD, M.; MUNDY, E.; FARAONE, S. Adaptive and biological families of children and adolescents with ADHD. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.39, p.1432-1437, 2000.

STAHL, S.M. **Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications**. 3. ed. Nova York: Cambridge University Press, 2008.

STEVENS, R.; COWEY, A. Effects of dorsal and ventral hippocampal lesions on spontaneous alternation, learned alternation and probability learning in rats. **Brain Res.**, v. 52, p. 203-224, 1973.

STREISSGUTH, A.P.; BARR, H.M.; SAMPSON, P.D.; BOOKSTEIN, F.L. Prenatal alcohol and offspring development: the first fourteen years. **Drug Alcohol Depend.**, v.36, n.2, p.89-99, 1994.

STREISSGUTH, A.P. The behavioral teratology of alcohol: Performance, behavioral and intellectual deficits in prenatally exposed children. *In*: WEST, J.R. (Ed.). **Alcohol and brain development**. New York: Oxford University Press, 1986. p.3-44.

STUSS, D.T.; LEVINE, B. Adult clinical neuropsychology: lessons from studies of the frontal lobes. **Ann. Rev. Psychol.**, v.53, p.401-433, 2002.

SULLIVAN, R.M.; BRAKE, W.G. What the rodent prefrontal cortex can teach us about attention-deficit/hyperactivity disorder: the critical role of early developmental events on prefrontal function. **Behavioural Brain Research**, v.146, n.1-2, p.43-55, 2003.

SWANSON, J.M.; FLODMAN, P.; KENNEDY, J.; SPENCE, M.A.; MOYZY, R.; SCHUCK, S.; MURIAS, M.; MORIATY, J.; BARR, C. SMITH, M.; POSNER, M. Dopamine genes and ADHD. **Neurol. Biobehav. Rev.**, v.24, p.21-25, 2000.

SWANSON, J.M.; SERGEANT, J.A.; TAYLOR, E.; SONUGA-BARKE, E.J.; JENSEN, P.S.; CANTWELL, D.P. Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. **Lancet**, v.351, p.429-433, 1998.

SZATMARI, P.; OFFORD, D.R.; BOYLE, M.H. Ontario Child Health Study: prevalence of attention-deficit disorder with hyperactivity. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v.30, p.219-230, 1989.

TAERK, E.; GRIZENKO, N.; BEN AMOR, L.; LAGEIX, P.; MBEKOU, V.; DEGUZMAN, R.; TORKAMAN-ZEHI, A.; TER STEPANIAN, M.; BARON, C.; JOOBER, R.; Catechol-O-methyltransferase (COMT) Val108/158 Met polymorphism does not modulate executive function in children with ADHD. **BMC Medical Genetics**, v.5, p.30, 2004.

TATSUMI, M.; GROSHAN, K.; BAKELY, R.; RICHELSON, E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. **Eur. J. Pharmacol.**, v.340, p.249–258, 1997.

TEHRANI-DOOST, M.; MOALLEMI, S.; SHAHRIVAR, Z. An open-label trial of reboxetine in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v.18, p.179-184, 2008.

TELLIOGLU, T.; ROBERTSON, D. Genetic or acquired deficits in the norepinephrine transporter: Current understanding of clinical implications. **Exp. Rev. Mol. Med.**, 2001, Disponível em: <<http://www.ermmebeu.cam.ac.uk/01003878h.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

THOMAS, J.D.; LA FIETTE, M.H.; QUINN, V.R.; RILEY, E.P. Neonatal choline supplementation ameliorates the effects of prenatal alcohol exposure on a discrimination learning task in rats. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.22, n.5, p.703-711, 2000.

TRENDELEMBURG, U. The TiPS lecture: Functional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline. **Trends Pharmacol, Sci.**, v.12, p.334-337, 1991.

UENO, K.I.; TOGASHI, H.; MORI, K.; MATSUMOTO, M.; OHASHI, S.; HOSHINO, A.; FUJITA, T.; SAITOB, H.; MINAMIC, M.; YOSHIOKA, M. Behavioural and pharmacological relevance of stroke-prone spontaneously hypertensive rats as an animal model of a developmental disorder. **Behavioural Pharmacology**, v. 13, p. 1-13, 2002.

VAN DER KOOIJ, M.A.; GLENNON, J.C. Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.31, n.4, p.597-618, 2007.

VANDERSCHUREN, L.J.; WARDEN, G.; DE VRIES, T.J.; MULDER, A.H.; SCHOFFELMEER, A.N. Opposing role of dopamine D1 and D2 receptors in modulation of rat nucleus accumbens noradrenaline release. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 4123-4131, 1999.

VIANA, M.B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.49, n.3, p. 549-54, 1994.

VIGGIANO, D.; RUOCCO, L.A.; ARCIERI, S.; SADILE, A.G. Involvement of Norepinephrine in the Control of Activity and Attentive Processes in Animal Models of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Neural Plasticity**, v.11, n.1, p.2, 2004.

VOELLER, K. Attention deficit disorders: Pathophysiology and treatment. *In*: MESULAM, M. M. (Ed.). **Behavioral neurology: consciousness and attention**. Washington, DC: Maio, 1994. v.7, p.35-48.

VOLKOW, N.D.; WANG, G.J.; FOWLER, J.S.; GATLEY, S.J.; LOGAN, J.; DING, Y.S.; HITZEMANN, R.; PAPPAS, N. Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. **Am. J. Psychiatry**, v.155, n.10, p.1325-1331, 1998.

WALLIS, D.; RUSSELL, H.F.; MUENKE, M. Genetics of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. **Journal of Pediatric Psychology**, v.33, n.10, p.1-15, 2008.

WANG, J.; SHEN, R.Y. Basic membrane properties of VTA dopamine neurons after prenatal alcohol exposure. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.26, p.149, 2002.

WATANABE, T.; MORIMOTO, K.; NAKAMURA, M.; SUWAKI, H. Modification of behavioral responses induced by electrical stimulation of the ventral tegmental area in rats. **Behavioural Brain Research**, v.93, p.119-129, 1998.

WEINSHILBOUM, R.M.; OTTERNESS, D.M.; SZUMLANSKI, C.L. Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.39, p.19-52, 1999.

WELSH, M.C. Developmental and clinical variations in executive functions. *In*: MOLFESE, D.L.; Molfese, V.J. (Ed.). **Developmental variations in learning: applications to social, executive function, language, and reading skills**. Mahwah, NJ: Erlbaum, 2002. p.139-185.

WEYANDT, L.L.; WILLIS, W.G. Executive functions in school-aged children: potential efficacy of tasks in discriminating clinical groups. **Dev. Neuropsychol.**, v.10, p.27-38, 1994.

WIESEL, E.A.; FUXE, K.; HOKFELT, T.; AGNATI, L.F. Studies on dopamine turnover in ovariectomized or hypophysectomized female rats. Effects of 17 beta-estradiol benzoate-ethynodioldiacetate and ovine prolactin. **Brain Research**, v.148, p.399-411, 1978.

WILENS, T.E.; BIEDERMAN, J.; SPENCER, T.J.; BOSTIC, J.; PRINCE, J.; MONTREAUX, M.C.; SORIANO, J.; FINE, C.; ABRAMS, A.; RATER, M.; POLISNER, D. A pilot controlled clinical trial of ABT-418, a cholinergic agonist, in the treatment of adults with attention deficit hyperactivity disorder. **Am. J. Psychiatry**, v.156, p.1931-1937, 1999.

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

WINOCUR, G. A comparison of normal old rats and young adult rats with lesions to the hippocampus or prefrontal cortex on a test of matching-to-sample. **Neuropsychologia**, v.30, p.769-781, 1992.

WONG, E.H.; SONNERS, M.S.; AMARA, S.G.; TINHOLT, P.M.; PIERCEY, M.F.; HOFFMANN, W.P.; HYSLOP, D.K. Reboxetine: a pharmacologically potent, selective, and specific norepinephrine reuptake inhibitor. **Biol. Psychiatry**, v. 47, p. 818-829, 2000.

XU, C.; SHEN, R.Y. Amphetamine normalizes the electrical activity of dopamine neurons in the ventral tegmental area following prenatal ethanol exposure. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.297, n.2, p.746-752, 2001.

YOUNG, J.B.; LANDSBERG, L. Cathecoamines and the adrenal medulla. *In*: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. (Ed.). **Williams textbook of endocrinology**. 9. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998. p.680-682.

ZAMETKIN, A.J.; RAPOPORT, J.L. Noradrenergic hypothesis of attention deficit disorder with hyperactivity: A critical review. *In*: MELTZER, H.Y. (Ed.). **Psychopharmacology: the third generation of progress**. New York: Raven Press, 1987. p.837-842.

ZANETKIN, A.J.; RAPPAPORT, J.L. Neurobiology of attention deficit disorder with hyperactivity: where have we come in 50 years? **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatr.**, v.26, p.676-686, 1987.

ZHANG, K.; TARAZI, F.I.; BALDESSARINI, R.J. Role of dopamine D(4) receptors in motor hyperactivity induced by neonatal 6-hydroxydopamine lesions in rats. **Neuropsychopharmacology**, v.25, p.624-632, 2001.

ZHOU, J. Norepinephrine transporter inhibitors and their therapeutic potential. **Drugs Future**, v.29, n.12, p.1235-1244, 2004.