

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

MARCUS VINICIUS SOARES DE LARA

**ANÁLISE DAS DIFERENÇAS NEUROQUÍMICAS E NEUROFUNCIONAIS ENTRE
HEMISFÉRIOS CEREBRAIS EM AMBOS OS SEXOS DO MODELO MURINO DO
TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE**

Porto Alegre

2019

MARCUS VINICIUS SOARES DE LARA

**ANÁLISE DAS DIFERENÇAS NEUROQUÍMICAS E NEUROFUNCIONAIS ENTRE
HEMISFÉRIOS CEREBRAIS EM AMBOS OS SEXOS DO MODELO MURINO DO
TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE**

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

Orientadora: Prof. Dr. Lisiane de Oliveira Porciúncula

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Lara, Marcus Vinicius Soares
ANÁLISE DAS DIFERENÇAS NEUROQUÍMICAS E
NEUROFUNCIONAIS ENTRE HEMISFÉRIOS CEREBRAIS EM AMBOS
OS SEXOS DO MODELO MURINO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE
ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE / Marcus Vinicius Soares
Lara. -- 2019.
55 f.
Orientador: Lisiane de Oliveira Porciúncula.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

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

MARCUS VINICIUS SOARES DE LARA

**ANÁLISE DAS DIFERENÇAS NEUROQUÍMICAS E NEUROFUNCIONAIS ENTRE
HEMISFÉRIOS CEREBRAIS EM AMBOS OS SEXOS DO MODELO MURINO DO
TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE**

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

Aprovado em: 05 de dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Liane da Silva de Vargas - UNIPAMPA

Dr. Cássio Moraes Loss - UNIFESP

Prof^a. Dr^a. Lisiane de Oliveira Porciúncula – UFRGS (orientadora)

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos do neurodesenvolvimento mais comuns da infância e adolescência, afetando cerca de 3,4% de crianças e adolescentes em todo o mundo. A tríade de sintomas se caracteriza por falta de atenção, hiperatividade e impulsividade. Esses sintomas apresentam-se diferentemente dependendo do sexo, com meninas apresentando em maior proporção o subtipo desatento, e meninos em maior proporção o subtipo hiperativo e impulsivo. Embora o TDAH seja considerado um transtorno complexo e multifatorial e com etiologia desconhecida, o desbalanço dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico é reconhecido como parte da etiologia do transtorno. Esses desbalanços podem estar relacionados com alterações da simetria fisiológica de estrutura e função entre os hemisférios cerebrais direito e esquerdo. O objetivo do presente estudo foi verificar alterações eletrofisiológicas e neuroquímicas em um modelo animal de TDAH, analisando o eletroencefalograma interhemisférios e verificando os efeitos das diferenças de sexo. Animais machos e fêmeas das linhagens SHR (*Spontaneously hypertensive rats*), modelo animal do TDAH, e Wistar Kyoto (WKY, linhagem progenitora dos animais SHR) foram submetidos à cirurgia para implantação de 4 eletrodos de superfície (2 eletrodos no lobo frontal, um no lobo frontal direito e outro no esquerdo; 2 eletrodos no lobo parietal, 1 no lobo parietal direito e outro no esquerdo) no 48º dia pós-natal. Ao 55º dia pós-natal foi realizado o registro do eletroencefalograma enquanto os animais exploravam livremente uma caixa de madeira e após a obtenção dos registros eles foram imediatamente eutanasiados e amostras do córtex frontal de ambos os hemisférios foram coletadas para imunodetectar a sinaptofisina, o transportador de dopamina (DAT) e o transportador de noradrenalina (NET) por *Western blotting*. Os animais SHR não apresentaram diferenças no índice de assimetria em relação aos animais controle WKY. Apesar disso, as fêmeas SHR apresentaram diferenças no poder de ondas alfa e theta entre os diferentes hemisférios, com maior poder no hemisfério direito em relação ao esquerdo. Em relação ao imunoconteúdo de proteínas, não houve diferença nos níveis totais de sinaptofisina, DAT e NET no córtex frontal entre os grupos. A análise da diferença inter-hemisférica revelou que os animais SHR não apresentaram diferenças, mas os WKY machos apresentaram diminuição no NET no hemisfério esquerdo em relação ao direito e as fêmeas WKY diminuição no DAT no hemisfério esquerdo comparado ao direito. As alterações encontradas na simetria cerebral nas fêmeas do modelo animal mais estudado para o TDAH, são frequentemente relatadas em distúrbios emocionais, como ansiedade e depressão, que, por sua vez, são comumente encontrados como comorbidades do TDAH. Apesar da identificação de alterações funcionais, ainda é preciso associá-las a outras alterações neuroquímicas responsáveis por tais manifestações.

Palavras-chave: TDAH, Assimetrias cerebrais, oscilações cerebrais, diferenças sexuais, SHR, dopamina

ABSTRACT

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common childhood onset psychiatric disorders and affects around 3.4% of children and adolescents worldwide. It is characterized by inattention, hyperactivity and impulsivity. Sex differences have been found in ADHD symptoms, with girls being more inattentive, while boys presenting the hyperactive/impulsive subtype. Although ADHD is considered to be a complex and multifactorial disorder with an unknown etiology, dysfunction in the dopaminergic and noradrenergic systems have been implicated in the ADHD etiology. Furthermore, this dysfunction has been associated with changes in the symmetry of physiological structure and function of both brain hemispheres. This study aimed to evaluate electrophysiological and neurochemical alterations in an animal model used for ADHD, considering sex differences and brain hemispheres symmetry. Male and female SHR (spontaneously hypertensive rats), the most validated model for ADHD, and Wistar Kyoto (WKY, control strain) were used. At post-natal day 48 (PND), animals were submitted to a surgical procedure to place 4 superficial electrodes (1 electrode in each hemisphere of the frontal and parietal lobes). At PND 55, electroencephalogram was recorded while the animals freely explored a wooden box. Then, animals were euthanized and both hemispheres were separated from frontal cortex for synaptophysin, dopamine transporter (DAT) and noradrenaline transporter (NET) immunocontent analysis. SHR did not present differences in the asymmetry index, but female SHR showed higher alpha and theta power in the right brain hemisphere. Strain differences were not found for synaptophysin, DAT and NET in the frontal cortex. However, male WKY showed less NET in the left hemisphere when compared to right, and DAT was decreased in the left hemisphere of female WKY. Changes reported in the brain symmetry in females from ADHD model are often reported in emotional disorders such as anxiety and depression, which are commonly found as ADHD comorbidities. Despite the identification of functional alterations, further studies are still necessary to associate them with other neurochemical alterations responsible for such manifestations.

Key-words: ADHD, Brain oscillations, brain asymmetry, sex differences, dopamine, SHR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Análise do índice de assimetria interhemisférica da média de poder registrada no córtex frontal e no córtex parietal.....	27
Figura 2 – Análise das diferenças interhemisféricas de poder por banda de oscilação no córtex frontal. Banda Theta no córtex frontal nos animais SHR machos, SHR fêmeas, WKYO machos e WKYO fêmeas.....	27
Figura 3 – Análise das diferenças interhemisféricas de poder por banda de oscilação no córtex frontal. Banda Alfa no córtex frontal nos animais SHR machos, SHR fêmeas, WKYO machos e WKYO fêmeas	28
Figura 4 – Análise do imunocontéudo total de NET, DAT e sinaptofisina no córtex frontal nos animais SHR machos, SHR fêmeas, WKYO machos e WKYO fêmeas.....	29
Figura 5 – Análise das diferenças interhemisféricas no imunocontéudo de NET no córtex frontal nos animais SHR machos, SHR fêmeas, WKYO machos e WKYO fêmeas.....	30
Figura 6 – Análise das diferenças interhemisféricas no imunocontéudo de DAT no córtex frontal nos animais SHR machos, SHR fêmeas, WKYO machos e WKYO fêmeas.....	31
Figura 7 – Análise das diferenças interhemisféricas no imunocontéudo de sinaptofisina no córtex frontal nos animais SHR machos, SHR fêmeas, WKYO machos e WKYO fêmeas.....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO COMPREENSIVA.....	8
1.1	O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE	8
1.1.1	Diagnóstico e tratamento	8
1.1.2	Diferenças de sexo.....	10
1.1.3	Neurobiologia do TDAH.....	11
1.1.4	Assimetrias cerebrais.....	11
1.1.5	Assimetrias cerebrais no TDAH.....	14
1.1.6	Modelo animal.....	15
1.2	JUSTIFICATIVA	17
1.3	OBJETIVOS.....	18
1.3.1	Objetivo geral.....	18
1.3.2	Objetivos específicos.....	18
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	19
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	43
	REFERÊNCIAS.....	44
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA LATERALITY: ASYMMETRIES OF BODY, BRAIN AND COGNITION.....	49

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é o transtorno do neurodesenvolvimento mais comum da infância, sendo caracterizado pela persistência dos sintomas de de desatenção, hiperatividade e impulsividade (Kenemans, 2005), com uma prevalência mundial de cerca de 3,4% (Polanczyk et al., 2015). Inicialmente, os sintomas poderiam persistir até a adolescência, porém atualmente já se sabe que em alguns casos os sintomas perduram até a vida adulta, o que caracteriza o TDAH como uma condição crônica de saúde (Barbaresi et al., 2013; Faraone et al., 2006). Tendo em vista a tríade de sintomas, a desatenção permanece com o aumento da idade, enquanto a hiperatividade e impulsividade atenuam com a idade (Palma et al., 2015).

Quanto à etiologia, há evidências de que alterações genéticas possam contribuir para a susceptibilidade ao transtorno, como mutações nos genes dos receptores de dopamina D2 e D4, e do transportador de dopamina (DAT). Além disso, fatores ambientais, tais como baixa classe social, complicações no parto e disfunções familiares também contribuem para a apresentação do transtorno (Faraone & Biederman, 1998). Ademais, o TDAH é frequentemente associado com comorbidades psiquiátricas, incluindo transtornos de ansiedade, depressão, transtorno opositivo desafiador e transtorno de conduta. O alto nível de comorbidades é encontrado em populações diversas, e tal associação aumenta a importância do transtorno como problema de saúde pública (Biederman et al., 2001; Spencer et al., 2007). Consequentemente, o TDAH tem um grande impacto para a sociedade em problemas familiares, além de impactar negativamente a autoestima, o desempenho acadêmico e profissional dos indivíduos comprometidos (Faraone & Biederman, 1998).

1.1.1 Diagnóstico e tratamento

Apesar dos recentes avanços na compreensão da neurobiologia do TDAH a partir de estudos utilizando modernas ferramentas de genética, biologia molecular, neurofarmacologia e neuroimagem, o diagnóstico ainda permanece essencialmente clínico (Kieling & Rohde, 2012). Uma vez que ainda não existem marcadores biológicos disponíveis com sensibilidade e especificidade suficiente, considerando a heterogeneidade da apresentação do transtorno (Rhode, 2008), a qual é possivelmente um reflexo das múltiplas causas do transtorno e dos

múltiplos fatores envolvidos na expressão de sintomas (Purper-Ouakil et al., 2011). Atualmente, o diagnóstico é baseado no Manual Diagnóstico de Desordens Mentais, 5ª edição (DSM-V), da Associação Americana de Psiquiatria (APA, 2013) e na CID-10 (Classificação Internacional de Doenças), da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1992). De acordo com o DSM-V, o TDAH se apresenta em três diferentes subtipos: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo/impulsivo e o subtipo combinado dos três sintomas. O diagnóstico é realizado com base em duas dimensões de sintomas: desatenção (como descuido em atividades escolares) e hiperatividade/impulsividade (como movimentar-se repetidamente com mãos ou pés enquanto está sentado, falar excessivamente), com a presença de no mínimo seis sintomas em uma ou nas duas dimensões, observados por um período mínimo de seis meses, em nível de apresentação inconsistente com a fase de desenvolvimento do paciente e com impacto negativo em atividades sociais e/ou acadêmicas/ocupacionais. Além disso, é preciso que haja a apresentação de sintomas desde uma idade menor do que 12 anos, que existam sintomas que se apresentem em diferentes contextos: em casa, na escola, com amigos, com familiares, e que esses sintomas não possam ser explicados por outras alterações neuropsiquiátricas e neurológicas (APA, 2013).

O psicoestimulantes são os medicamentos mais utilizados para o tratamento farmacológico, sendo a terapêutica de primeira linha a utilização do metilfenidato (Seixas et al., 2012), cuja ação é bloquear o transportador de dopamina (DAT), e secundariamente também o transportador de noradrenalina (NET), aumentando a concentração de ambos os neurotransmissores na fenda sináptica (Boix et al., 1998). Os efeitos terapêuticos da estimulação dopaminérgica podem envolver o enfraquecimento de transmissões inapropriadas, enquanto a estimulação noradrenérgica pode estar envolvida com o fortalecimento de conexões importantes no córtex pré-frontal relacionadas com a regulação da atenção e regulação emocional (Arnsten, 2009). O tratamento com metilfenidato mostra-se eficaz em cerca de 70-80% dos pacientes, sendo considerado uma das drogas mais eficazes da psiquiatria e da medicina (Leucht et al., 2012). A atomoxetina, um inibidor seletivo da reabsorção de noradrenalina pelo NET, também é reconhecido como tratamento de primeira escolha e, outras drogas como bupropiona, clonidina, guanfacina e antidepressivos tricíclicos são recomendadas para pacientes que não respondem bem ao tratamento de primeira linha ou que sofrem de comorbidades (Seixas et al., 2012).

Apesar da alta eficiência do tratamento farmacológico, algumas limitações são apresentadas. Primeiramente, uma proporção dos pacientes sofrem com efeitos adversos como boca seca, insônia e redução do apetite, entre outros (Wilens et al., 2011). Ademais, uma

fração dos pacientes que responde ao tratamento com psicoestimulantes ainda mantem-se apresentando a remissão da maior parte, mas não da totalidade de seus sintomas (Solanto et al., 2010). Portanto, adicionalmente ao tratamento farmacológico, existe consenso na necessidade de intervenção psicossocial (Safren et al., 2010; Seixas et al., 2012).

1.1.2 Diferenças de sexo

A prevalência do TDAH varia entre meninos e meninas, sendo os meninos diagnosticados em uma proporção de 3:1 (Singh, 2008). A maior parte dos estudos avaliando o transtorno utilizam amostras homogêneas de pacientes ou de modelos animais, geralmente analisando somente o sexo masculino, o que dificulta a generalização de achados para as meninas, e a menor compreensão do transtorno para o sexo feminino pode estar associada com a menor proporção de diagnósticos (Gershon, 2002). A diferença na prevalência também pode estar associada com a apresentação fenotípica do transtorno, e tem impacto substancial no diagnóstico pois as meninas apresentam predominantemente o subtipo desatento, o qual é mais facilmente ser administrado na idade escolar em comparação com os comportamentos disruptivos mais comuns em meninos, que apresentam o subtipo hiperativo/impulsivo (Gaub & Carlson, 1997). As meninas têm menor probabilidade de apresentar problemas relacionados ao transtorno na escola, como problemas de aprendizagem, e menor risco de desordens associadas ao comportamento agressivo, além de menores prejuízos no convívio social (Biederman et al., 2002). As meninas que são direcionadas para avaliação psiquiátrica podem apresentar comportamentos disruptivos, mas não representam a maioria diagnosticada com TDAH. Mulheres adultas diagnosticadas com TDAH têm maiores chances de desenvolver transtornos de ansiedade, depressão e sintomas somáticos quando comparadas aos homens, os quais têm maiores chances de exposição a comportamento de risco, abuso de substâncias ilícitas, transtornos de conduta e de personalidade (Williamson & Johnston, 2015). A compreensão das diferenças de sexo no transtorno é crítica para a disseminação de informações sobre as diferentes manifestações, e conseqüentemente para melhor identificação da desordem e um diagnóstico mais eficiente (Gershon, 2002).

Em pesquisas pré-clínicas com modelos animais em laboratório, a utilização exclusiva de machos, verificada em diversas áreas, como na neurociência, pode dificultar a compreensão das influências de sexo em processos biológicos e de saúde (Shansky & Woolley, 2016), uma vez que a existência de diferenças bioquímicas, fisiológicas, de estrutura e função no sistema nervoso de machos e fêmeas é amplamente aceita (Panzica & Melcangi,

2016). Apesar da participação de fatores sociais e culturais em distúrbios do sistema nervoso, diferenças sexuais não podem ser negligenciadas na etiologia e na fisiopatologia de transtornos (Shansky & Woolley, 2016).

1.1.3 Neurobiologia do TDAH

As principais alterações neurológicas encontradas no TDAH, a partir de evidências provenientes de estudos de neuroimagem, são presentes em circuitos fronto-estriatais e parietais, nas aferências dopaminérgicas e noradrenérgicas, com distúrbios em regiões envolvidas nos processos de atenção e de controle executivo (Curatolo et al., 2009). Os pacientes com TDAH têm distúrbios na recaptção, armazenamento e/ou metabolismo da dopamina, apresentando hipoatividade dopaminérgica nas vias mesolímbica, mesocortical e nigroestriatal (Russell, 2002). A dopamina seleciona estímulos excitatórios para o córtex pré-frontal e também para o córtex cingulado, de maneira a reduzir atividade neuronal irrelevante para o controle executivo durante a realização de tarefas. Por outro lado, evidencia-se hiperatividade noradrenérgica, especialmente no córtex frontal, relacionada à disfunção dos receptores α -1 pré-sinápticos inibitórios de noradrenalina, possivelmente causando déficits no controle inibitório (Russell, 2002). No locus coeruleus, a atividade inapropriada de auto-receptores inibitórios noradrenérgicos pode estar associada com aumento da reatividade a estímulos sensoriais, assim como a déficits na capacidade de sustentar a atenção, ambos característicos do TDAH (Mefford & Potter, 1989).

1.1.4 Assimetrias cerebrais

Em humanos e em outros animais mamíferos, os dois hemisférios cerebrais diferem em anatomia e função. A assimetria interhemisférica é uma característica também compartilhada por vertebrados e invertebrados (Duboc et al., 2015). Considera-se que essa lateralização tenha se originado de fatores evolutivos, hereditários, de desenvolvimento e também patológicos. Como exemplo, a linguagem é geralmente lateralizada no hemisfério esquerdo, possivelmente evitando a competição entre os hemisférios sobre o controle dos músculos da articulação da fala, e também sendo mais eficiente na transferência de informação entre estruturas específicas de um só hemisfério (Toga & Thompson, 2003). Cérebros mais assimétricos tendem a apresentar uma redução da área do corpo caloso em relação àqueles mais simétricos, o que pode refletir em uma redução de volume ou de

quantidade de fibras axonais conectando os dois hemisférios (Witelson, 1985). Portanto, a lateralização de funções pode ter se dado por uma desvantagem na duplicação de estruturas cerebrais, pelos limites de tempo para transmissão através do corpo caloso de um hemisfério para o outro e também por permitir a realização de tarefas paralelamente nos dois hemisférios (Toga & Thompson, 2003). A especialização hemisférica também já é bastante documentada para outras funções, por exemplo, Gazanigga et al (1962) avaliaram os efeitos da remoção cirúrgica do corpo caloso em pacientes, e foi perceptível a sua incapacidade de nomear objetos apresentados no seu campo visual esquerdo ou tocados pela sua mão esquerda, mas o mesmo problema não era apresentado para campo visual e mão contralaterais. A lateralização hemisférica para funções cognitivas provavelmente reflete uma diferença de circuitos neurais entre os hemisférios, correlacionados com assimetrias nas substâncias branca e cinzenta (Duboc et al., 2015).

A assimetria na distribuição sináptica de receptores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) da subunidade épsilon 2 em circuitos hipocâmpais foi reportada em roedores, com alterações nas propriedades desses receptores entre os hemisférios, interferindo para um processo de plasticidade sináptica diferente no hipocampo esquerdo e direito (Kawakami et al., 2003). O fato da lateralização ter sido evolutivamente conservada ou independentemente adquirida por animais sugere que ela ofereça vantagens, e portanto, a sua perda pode ser prejudicial (Duboc et al., 2015).

Do ponto de vista funcional, há propriedades particulares do eletroencefalograma (EEG) que demonstram uma modesta assimetria encontrada em indivíduos saudáveis (Weber, 2005), porém desvios nessa lateralidade podem ser mecanismos responsáveis pela manifestação de distúrbios neurológicos e psiquiátricos (Glick et al., 1982). A assimetria no córtex frontal nas oscilações alfa (8-12 Hz) é representativa nesse caso, uma vez que esse parâmetro é utilizado por pesquisadores para o estudo de temperamento, personalidade, diferentes psicopatologias, motivação, emoção e controle cognitivo (Smith et al., 2017). Ademais, a assimetria frontal de ondas alfa também já é considerada como um bioindicador válido para depressão (Quraan et al., 2014). Há evidências de que um aumento de ondas alfa no hemisfério esquerdo em relação ao direito esteja associado com alterações nas respostas a estímulos positivos e negativos, com um aumento de emoções positivas. Por outro lado, um aumento nas ondas alfa no hemisfério direito em relação ao esquerdo estaria associado com uma alteração na resposta apenas a estímulos negativos, e não aos positivos e neutros, apresentando um aumento em respostas hormonais e do sistema nervoso autônomo ao

estresse, resultando em motivação reduzida, tristeza e medo (Coan & Allen, 2004; Meyer et al., 2015).

Do ponto de vista neuroquímico, os neurotransmissores dopamina e noradrenalina apresentam conteúdo e função diferentes entre hemisfério direito e esquerdo (Toga & Thompson, 2003). Budilin et al (2008) demonstraram por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) que os ratos que utilizam preferencialmente a pata dianteira direita para alcançar alimento têm maiores níveis de dopamina no núcleo accumbens direito, e os ratos que utilizam preferencialmente a pata esquerda para a mesma tarefa também apresentam maiores níveis desse neurotransmissor no núcleo accumbens ipsilateral. Os níveis de dopamina apresentam variações interhemisféricas no córtex pré-frontal medial e no estriado, e da mesma maneira, houve um impacto comportamental da assimetria do conteúdo de dopamina na pata de preferência dos animais e no sentido do movimento de rotação apresentado por roedores (Nielsen et al., 1997). Em humanos, a dopamina também apresenta assimetria conforme estudos post-mortem no cérebro de indivíduos saudáveis, especialmente com maior conteúdo no globo pálido esquerdo em relação ao direito, porém não foi possível associar a significância funcional de tais achados (Glick et al., 1982). Os neurônios noradrenérgicos apresentam-se lateralizados no tálamo, sendo mais abundantes no núcleo ventral lateral direito (Oke et al., 1980). É possível que o aumento da atividade noradrenérgica em algumas estruturas do hemisfério direito esteja associado com a manutenção de um estado de alerta e com a orientação adequada à novos estímulos (Toga & Thompson, 2003).

Um importante fator a ser levado em consideração é o dimorfismo sexual quando analisadas as assimetrias interhemisféricas. Em homens, são documentadas evidências que sugerem eles apresentam maior lateralização do que as mulheres (Hirnstein et al., 2019). As análises de EEG durante a visualização de fotografias de faces de desconhecidos revelou que os homens apresentaram uma resposta elevada no hemisfério direito, enquanto as mulheres apresentaram respostas em ambos os hemisférios (Proverbio et al., 2010). Dentre as estruturas assimétricas, o *Planum temporale* (área cortical posterior ao córtex auditivo, funcionalmente associado ao processamento de informação auditiva) é o que apresenta maior assimetria relacionada ao sexo, dentre um conjunto de estruturas avaliadas por ressonância magnética (Guadalupe et al., 2015). Os pesquisadores ainda foram capazes de encontrar uma relação entre a assimetria dessa região e a apresentação de variações nos genes relacionados a hormônios esteroides, reforçando a hipótese de dimorfismo sexual. Em uma meta-análise de estudos de neuroimagem, Stevens & Hamann (2012) concluíram que mulheres apresentam maior resposta emocional a estímulos negativos na amígdala esquerda, enquanto homens

apresentam maior resposta emocional a estímulos positivos, também na amígdala esquerda. De acordo com os autores, tal achado pode estar associado a um maior risco de desenvolvimento de depressão e de transtornos de ansiedade em mulheres. As assimetrias também já foram associadas com diferenças em performance cognitiva, apesar de homens e mulheres desempenharem de maneira similar a maior parte dos testes cognitivos realizados em sujeitos saudáveis (Hirnstein et al., 2019).

1.1.5 Assimetrias cerebrais no TDAH

As assimetrias cerebrais podem modular, exacerbar ou contribuir para o surgimento de distúrbios neuropsiquiátricos (Douglas et al., 2018). Em estudos de ressonância magnética foram observadas diferenças estruturais e funcionais entre os hemisférios cerebrais em humanos e modelos animais do TDAH. Dentre elas, observaram-se reduções no volume do núcleo caudado esquerdo, principalmente em meninos, além de maiores índices de assimetria no hipocampo, tálamo e amígdala em pacientes com TDAH que eram mais evidentes em pacientes que não estavam em tratamento com psicoestimulantes (Douglas et al., 2018; Hynd et al., 1993). Ademais, redução do fluxo sanguíneo cerebral na porção ventral do córtex pré-frontal medial e do córtex orbitofrontal no hemisfério direito, a qual foi revertida pelo tratamento com metilfenidato em crianças com TDAH (Lee et al., 2005). Também foram relatadas assimetrias no eletroencefalograma quantitativo entre os hemisférios direito e esquerdo em relação ao poder absoluto nas regiões parietal e temporal posterior, e elevada coerência no formato de ondas de cada oscilação (delta, theta, beta, alfa e gama) em regiões frontais (Chabot et al., 1998). Em modelos animais do TDAH, evidenciou-se assimetria no metabolismo de dopamina, com reduções no nível desse neurotransmissor no núcleo accumbens direito, os quais estiveram associados com um comportamento impulsivo dos animais. Estas alterações neuroquímicas e comportamentais foram revertidos com uma droga inibidora da enzima MAO-B, responsável por degradar monoaminas (Boix et al., 1998). Uma possível restauração da funcionalidade simétrica nos sistemas de neurotransmissores entre os hemisférios pode estar envolvida nos efeitos benéficos promovidos pelo tratamento com psicoestimulantes (Boix et al., 1998; Malone et al., 1993). Porém, Li et al (2019) também observaram uma redução na assimetria lateral em redes de conectividade na substância branca no cérebro utilizando técnicas de imagem por tensor de difusão em pacientes com TDAH em relação a controles pareados por idade. Além disso, um estudo longitudinal de ressonância magnética encontrou um padrão de desenvolvimento de assimetrias ao longo dos anos em

indivíduos saudáveis, caracterizado por maior aumento da espessura do córtex cerebral na região frontal do hemisfério direito, e também maior aumento na espessura na região parietal do hemisfério esquerdo. Indivíduos com TDAH também demonstraram o mesmo padrão ao longo dos anos no córtex parietal, porém no córtex frontal não houve aumento de diferenças entre os hemisférios. Desse modo, observa-se que alterações na lateralidade podem ocorrer por redução ou excesso em relação ao padrão de lateralidade considerado normal (Shaw et al., 2009).

1.1.6 Modelo animal

O TDAH é uma desordem heterogênea, com contribuição de fatores tanto genéticos quanto ambientais, e portanto, a utilização de modelos animais tem contribuído na compreensão e melhor conhecimento de suas bases neurobiológicas (Simchon et al., 2010). A utilização de modelos animais requer que os mesmos mimetizem os sintomas (validade de face), as bases fisiopatológicas apresentadas em humanos (validade de construto), e sejam capazes prover informações anteriormente desconhecidas sobre a desordem (validade preditiva) (Sontag et al., 2010). Algumas das características do TDAH já foram observadas em modelos animais. Existem modelos cuja apresentação das características necessárias se dá pela exposição ao estresse (exemplo: durante a gravidez), resultando em hiperatividade que é reduzida com o tratamento com antagonistas dopaminérgicos (Son et al., 2007). Por outro lado, a indução do modelo pode ocorrer através de intervenções farmacológicas, como a destruição de neurônios dopaminérgicos com a exposição de neonatos à 6-hidroxi-dopamina, resultando em hiperatividade, a qual é antagonizada por psicoestimulantes (Davids et al., 2002). Finalmente, há modelos genéticos que também apresentam as características necessárias para a sua utilização como modelos animais do TDAH. Os animais knock-out para o gene da proteína DAT (DAT-KO) são um exemplo, tendo em vista que demonstram, principalmente, alteração no sistema dopaminérgico, além de hiperatividade que é atenuada através de psicoestimulantes. Apesar disso, pacientes com TDAH não parecem demonstrar redução nos níveis de DAT (Sontag et al., 2010). Outro modelo genético é a cepa de ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) um dos modelos animais mais estudados e validados (Meneses et al., 2011). Embora estes ratos apresentem hipertensão na vida adulta, os animais SHR apresentam alterações comportamentais características do TDAH durante o seu desenvolvimento, como a hiperatividade, percebida no aumento da distância percorrida na tarefa de campo aberto, e

impulsividade, percebida em tarefas em que os animais são apresentados com uma escolha: receber imediatamente uma menor recompensa (exemplo: ração, após um período de restrição alimentar), ou aguardar por períodos definidos para receber uma maior quantidade de ração. Animais SHR tendem a optar pela recompensa imediata (Boix et al., 1998). Também têm problemas na atenção (apenas quando o estímulo é espaçado ao longo do tempo, ou seja, problemas em sustentar a atenção por períodos prolongados), preenchendo o critério de validade de face (Sagvolden et al., 2005). Além disso, apresentam hipofunção dopaminérgica especialmente nas vias mesolímbica e mesocortical de maneira similar a humanos, apresentando assim validade de construto (Sagvolden et al., 2005). Ademais, o modelo é capaz de prever correlatos de TDAH em seres humanos no que se refere a comportamento, com potencial para identificação de alterações genéticas, neurobiológicas e do efeito de intervenções farmacológicas, preenchendo o critério de construto teórico (Sagvolden et al., 2005). O modelo responde ao tratamento com metilfenidato, apresentando melhora da atenção, aparentemente pela modulação da atividade do córtex pré-frontal, uma vez que essa região é responsável pela coordenação de estímulos que é necessária para a solução de problemas que envolvem atenção, e circuitos dopaminérgicos têm papel importante na mesma (Hart et al., 2013). Além disso, há melhora de memória nesses animais após a administração de metilfenidato (Fuermaier et al., 2017). Mesmo considerando que déficits de memória não são sintomas primários do TDAH, já foram reportados problemas na memória declarativa (Skodzik et al., 2017), além de diminuição do tamanho do hipocampo, estrutura essencial nos processos de memória, como aquisição e evocação (Hoogman et al., 2017). Essa função cognitiva esteve especificamente prejudicada nos animais SHR na tarefa de reconhecimento de objetos (memória de reconhecimento) e na tarefa de evitação ativa (aprendizado associativo) (Leffa et al., 2019), apesar de que problemas de atenção podem afetar diretamente os resultados na tarefa de campo aberto. Finalmente, o tratamento com metilfenidato reduziu o comportamento impulsivo em animais SHR, assim como é percebido em pacientes com TDAH (Leffa et al., 2019). Apesar disso, não foram verificados efeitos na hiperatividade, avaliada pela locomoção dos animais, mesmo com a utilização de diferentes doses. Ainda, doses de 10 mg/Kg induziram aumento da locomoção nos animais, o que é possivelmente associado com excesso de estímulo do sistema nervoso simpático e que pode sinalizar diferenças na fisiopatologia apresentado pela cepa de animais SHR (Leffa et al., 2019). Considerando essas características, o modelo animal escolhido para mimetizar o TDAH, nesse trabalho, foi a cepa de animais SHR.

1.1 JUSTIFICATIVA

Dadas as evidências de alterações assimétricas nos hemisférios cerebrais no TDAH, que envolvem diferenças no sistema dopaminérgico, noradrenérgico e nos registros eletroencefalográficos, torna-se importante identificar o padrão eletroencefalográfico inter-hemisférico no modelo animal utilizado para os estudos do TDAH. O conhecimento deste padrão eletroencefalográfico inter-hemisférico permitirá um melhor entendimento das bases fisiopatológicas do transtorno. A utilização de abordagem neurofuncional translacional não somente permite como favorece o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para este transtorno.. Essa análise será realizada em animais machos e fêmeas, levando em conta a importância das diferenças de sexo no sistema nervoso, tanto fisiológicas quanto aquelas apresentadas em transtornos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Identificar se existem diferenças neuroquímicas e funcionais entre os hemisférios cerebrais no modelo animal que mimetiza o TDAH (SHR) comparados com o seu controle Wistar Kyoto (WKY).

1.2.2 Objetivos específicos

- Verificar o imunoconteúdo do transportador de dopamina (DAT), do transportador de noradrenalina (NET) e da sinaptofisina no córtex frontal de ambos os hemisférios nos animais da linhagem SHR quando comparadas com o controle (WKY).
- Verificar a atividade elétrica cerebral através do eletroencefalograma em ambos os hemisférios durante a realização de uma tarefa comportamental na linhagem SHR e WKY.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Periódico: Laterality: Asymmetries of Body, Brain and Cognition.

Título: Análise das diferenças neuroquímicas e neurofuncionais entre hemisférios cerebrais em ambos os sexos do modelo murino do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

Normas da revista: disponível em <https://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?show=instructions&journalCode=plat20#prep> e anexo I.

ANÁLISE DAS DIFERENÇAS NEUROQUÍMICAS E NEUROFUNCIONAIS ENTRE HEMISFÉRIOS CEREBRAIS EM AMBOS OS SEXOS DO MODELO MURINO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

Marcus Vinicius Soares de Lara, Gabriel Cardozo Muller, Letícia Barbieri Caus, Maria Elisa Calcagnotto, Lisiane de Oliveira Porciúncula*

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

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

Endereço de e-mail: loporciuncula@yahoo.com

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns da infância e adolescência e caracteriza-se por desatenção, hiperatividade e impulsividade. Esses sintomas apresentam-se diferentemente dependendo do sexo. O TDAH é associado a um desbalanço dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico, que podem estar relacionados com alterações da simetria entre os hemisférios cerebrais, as quais foram verificadas neste trabalho. Foram verificadas alterações eletrofisiológicas e neuroquímicas em um modelo animal de TDAH, verificando as diferenças de sexo e interhemisféricas. Foram implantados eletrodos no córtex frontal e parietal nos animais SHR (modelo do TDAH), e Wistar Kyoto (WKY, animais controle) no 48º dia pós-natal. Ao 55º dia pós-natal foi realizado o registro do eletroencefalograma. Avaliou-se o imunoconteúdo de sinaptofisina, transportador de dopamina e transportador de noradrenalina no córtex frontal de ambos os hemisférios. Os animais SHR não apresentaram diferenças no índice de assimetria em relação aos controles WKY. As fêmeas SHR apresentaram diferença no poder de ondas alfa e theta entre os hemisférios. Na análise de diferença interhemisférica os SHR não apresentaram diferenças em nenhuma das proteínas. Os resultados encontrados evidenciam alterações na assimetria cerebral no modelo do TDAH, principalmente nas fêmeas, essas alterações são apresentadas em transtornos emocionais, frequentemente comorbidades no TDAH.

Palavras-chave: TDAH, SHR, Assimetrias cerebrais, EEG.

1. Introdução

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é o transtorno do neurodesenvolvimento mais comum da infância, sendo caracterizado por níveis inapropriados de desatenção, hiperatividade e impulsividade (Kenemans, 2005), e apresentando uma prevalência mundial de cerca de 3,4% (Polanczyk et al., 2015). A prevalência do TDAH varia entre meninos e meninas, sendo os meninos diagnosticados mais frequentemente, em uma proporção de 3:1 (Singh, 2008). Cerca de 65% dos pacientes diagnosticados na infância persistem apresentando o transtorno na vida adulta (Barbarese et al., 2013; Faraone et al., 2006). Quanto à etiologia, há evidências de mutações nos genes dos receptores de dopamina D2 e D4, e do transportador de dopamina (DAT). Além disso, fatores ambientais também contribuem para a sua apresentação (Faraone & Biederman, 1998). Ademais, o TDAH é frequentemente associado com comorbidades psiquiátricas, incluindo transtornos de ansiedade, depressão, transtorno opositivo desafiador e transtorno de conduta (Biederman et al., 2001).

Quanto à fisiopatologia, as principais alterações neurológicas encontradas no TDAH, a partir de evidências provenientes de estudos de neuroimagem, são presentes em circuitos fronto-estriatais e parietais, nas aferências dopaminérgicas e noradrenérgicas, apresentando hipoatividade dopaminérgica nas vias mesolímbica, mesocortical e nigroestriatal com desordens em regiões envolvidas nos processos de atenção e de controle executivo (Curatolo et al., 2009). Por outro lado, evidencia-se hiperatividade noradrenérgica, especialmente no córtex frontal, relacionada à disfunção dos receptores α -1 pré-sinápticos inibitórios de noradrenalina, possivelmente causando déficits no controle inibitório (Russell, 2002).

Os distúrbios neuropsiquiátricos podem modular, exacerbar ou surgir a partir de assimetrias cerebrais (Douglas et al., 2018). Considera-se que assimetrias cerebrais apresentam-se em humanos e em outros animais mamíferos, havendo diferenças entre os dois hemisférios cerebrais em anatomia e função. Foram observadas diferenças estruturais e funcionais entre os hemisférios cerebrais em humanos e modelos animais do TDAH tais como reduções no volume do núcleo caudado esquerdo, principalmente em meninos, além de maiores índices de assimetria no hipocampo, tálamo e amígdala em paciente com TDAH no geral (Douglas et al., 2018; Hynd et al., 1993). Ademais, redução do fluxo sanguíneo cerebral na porção ventral do córtex pré-frontal medial e do córtex orbitofrontal no hemisfério direito (Lee et al., 2005). Também foram relatadas assimetrias no eletroencefalograma quantitativo

entre os hemisférios direito e esquerdo em relação ao poder absoluto nas regiões parietal e temporal posterior (Chabot et al., 1998). Em modelos animais do TDAH, evidenciou-se assimetria no metabolismo de dopamina, com reduções no nível desse neurotransmissor no núcleo accumbens direito (Boix et al., 1998).

Algumas das características do TDAH já foram observadas em modelos animais, sendo a cepa de ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) o modelo animal mais aceito e validado (Meneses et al., 2011). Os animais SHR apresentam alterações comportamentais características do TDAH durante o seu desenvolvimento, apresentam hipofunção dopaminérgica especialmente nas vias mesolímbica e mesocortical (Sagvolden et al., 2005). Ademais, o modelo é capaz de prever correlatos de TDAH em seres humanos no que se refere a comportamento (Sagvolden et al., 2005). O modelo responde ao tratamento com metilfenidato, apresentando melhora da atenção, memória e impulsividade (Hart et al., 2013; Fuermaier et al., 2017) apesar de não evidenciar-se impacto na hiperatividade (Leffa et al., 2019).

Considerando evidências de alterações assimétricas nos hemisférios cerebrais no TDAH, tanto no aspecto neuroquímico quanto no aspecto neurofuncional, torna-se importante caracterizar essas alterações em ambos os sexos de um modelo animal que mimetize o TDAH (SHR). Uma vez compreendidas essas modificações, alcança-se um melhor entendimento das bases fisiopatológicas do transtorno, e torna-se possível investigar intervenções terapêuticas que contribuam para a melhora dos sintomas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi identificar se existem diferenças neuroquímicas e funcionais entre os hemisférios cerebrais no modelo animal que mimetiza o TDAH comparados com o seu controle Wistar Kyoto (WKY). Para isso foram utilizadas técnicas de eletroencefalografia durante a realização de uma tarefa comportamental e através da técnica *Western blot* foram identificados o imunoconteúdo de determinadas proteínas no córtex frontal dos animais.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais

Foram utilizadas para o estudo a animais machos e fêmeas da cepa SHR (Spontaneously hypertensive rats), que foi criada a partir de progenitores WKY (Wistar Kyoto) (n= 5-9 animais/grupo). Portanto, animais machos e fêmeas da cepa WKY foram selecionados como controle para os SHR. Os animais foram provenientes do Biotério Setorial

do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais foram alimentados com ração comercial e água a vontade e mantidos em gaiolas residências nas salas de experimentação do próprio biotério, as quais são mantidas em temperatura de 22 ± 2 °C, umidade entre 60-80% e ciclo claro/escuro de 12 horas. Após a realização do registro do EEG no 55º dia pós-natal (DPN), os animais foram eutanasiados por decapitação, sendo dissecado a região encefálica do córtex frontal para posterior análise por Western Blotting. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com o Guia para Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório (NIH Guide) e com a Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA-UFRGS – Número do protocolo 29196).

2.2 *Western Blotting*

Após a realização dos testes no 55º dia pós-natal (DPN), foi dissecada a região do córtex frontal. O imunoconteúdo do transportador de dopamina (DAT), transportador de noradrenalina (NET) e de sinaptofisina foi avaliado no córtex frontal de animais SHR e WKY machos e fêmeas. A estrutura foi homogeneizada utilizando SDS 5% (dodecil sulfato de sódio) com 0,1% de inibidores de fosfatases e proteases (Sigma, São Paulo/Brasil) e armazenada a -20 °C. A quantificação da proteína total foi determinada pelo ensaio do ácido bicinonínico (BCA, Pierce), utilizando albumina sérica bovina (ASB) como padrão (Sigma-Aldrich, São Paulo/Brasil). As amostras foram normalizadas para a quantidade final de proteína de 2 µg/µL. Cerca de 40 µg de proteína foram aplicadas em gel poliacrilamida por SDS-PAGE (12% gel de corrida). Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose (Amersham, São Paulo/Brasil). O bloqueio foi realizado durante uma hora à temperatura ambiente. As membranas para marcação de DAT e NET foram bloqueadas e incubadas com 3% de albumina sérica bovina (ASB) em solução salina tamponada com Tris e Tween-20 0,1% (TBS-T). Para a marcação de sinaptofisina, as membranas foram bloqueadas e incubadas com 5% leite desnatado em solução salina tamponada contendo Tris e Tween-20 0,1% (TBS-T). A incubação foi realizada *overnight* (durante a noite) à 4 °C com os seguintes anticorpos primários: monoclonal de rato anti-DAT (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, São Paulo/Brasil), policlonal de coelho anti-NET (1:1000, Abcam) e policlonal de coelho anti-sinaptofisina (Sigma-Aldrich, São Paulo/Brasil). As membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com seus respectivos anticorpos secundários conjugados a *horseradish peroxidase* (HRP) por

1h à temperatura ambiente e a revelação foi feita com a adição do substrato quimioluminescente ECL (Amersham, São Paulo/Brasil). As membranas foram visualizadas no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Life Sciences). A análise densitométrica foi realizada utilizando o software ImageJ. A β -tubulina é uma proteína constitutiva e foi utilizada como controle endógeno para a expressão de proteínas, sendo quantificada pela incubação do anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -tubulina (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, São Paulo/Brasil).

2.3 Implantação do eletrodos

Os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e colocados no aparato estereotáxico para a implantação de eletrodos. Eletrodos inoxidáveis subdurais foram implantados no córtex frontal (AP + 3,2; LL \pm 2,0) e córtex parietal (AP - 3,6; LL \pm 2,2), sendo, no total, 5 eletrodos. O eletrodo referência foi colocado no osso occipital e um parafuso foi inserido no osso frontal para fixação. Os eletrodos foram fixados com acrílico dental. Após a cirurgia, cada animal foi colocado em uma caixa individual para o período de recuperação de 7 dias, anteriores ao registro do EEG.

2.4 Eletroencefalograma

Cada animal foi colocado na arena de campo aberto, os eletrodos foram conectados a um amplificador (MAP-32, Plexon, Inc.). O registro de EEG foi realizado em todos os animais por 20 minutos. Os sinais do EEG foram filtrados de 0,01-100 Hz, seguido por uma digitalização a 1 kHz para análise posterior. O poder de cada banda de frequência foi expresso considerando 4 períodos de 30 segundos de experimento para cada animal.

2.5 Obtenção dos dados do EEG

Os dados foram analisados no software MATLAB (MathWorks Inc.) utilizando rotinas customizadas. A densidade do espectro de poder foi calculada por médias do método de periodograma de Welch utilizando a função `pwelch.m` das ferramentas de processamento de sinais. A análise foi realizada em 4 períodos de 30 segundos para cada animal. O sinal decomposto foi analisado em sete bandas de frequências: delta (1-4 Hz), theta (4-8 Hz), alfa

(8-12 Hz), beta (12-30 Hz) e três subfrequências de gama (slow gamma: 30-50 Hz; middle gamma: 50-90 Hz; high gamma: 90-150 Hz).

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de ANOVA de duas vias seguida de *post hoc* de Tukey para múltiplas comparações, cujos fatores foram linhagem e sexo, para os parâmetros avaliados entre grupos. Para as comparações entre hemisférios cerebrais, foi utilizado teste t de *student* pareado. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média para o eletroencefalograma e para o *Western Blotting*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. Foi utilizado o software *Graphpad Prism 6.0* para Windows.

3. Resultados

3.1 Alterações eletroencefalográficas

A análise do score de assimetria de poder registrado no EEG foi analisada a partir da média de poder registrada em cada eletrodos nos 4 períodos de 30 segundos selecionados, sem considerar frequência específica de oscilação. A ANOVA de duas vias não encontrou diferenças entre os grupos no córtex frontal para linhagem ($F_{(1,20)}=0,3$; $P=0,5437$) e para sexo ($F_{(1,20)}=0,4$; $P=0,5230$; figura 1A), e também não apresentou diferenças no córtex parietal para linhagem ($F_{(1,20)}=0,0$; $P=0,8775$) e para sexo ($F_{(1,20)}=1,1$; $P=0,2966$; figura 1B). Para avaliar a assimetria de poder entre os hemisférios em cada grupo, foi realizado teste t de *student* comparando o poder registrado em cada banda de frequência no hemisfério direito em relação ao esquerdo. As fêmeas SHR apresentaram diferenças significativas no córtex frontal para as bandas theta ($P=0,0077$; figura 2B) e alfa ($P=0,0184$; figura 3B). Os SHR machos não apresentaram diferenças interhemisféricas em nenhuma banda, inclusive naquelas apresentadas pelas fêmeas, theta ($P=0,9920$; figura 2A) e alfa ($P=0,8224$; figura 3A).

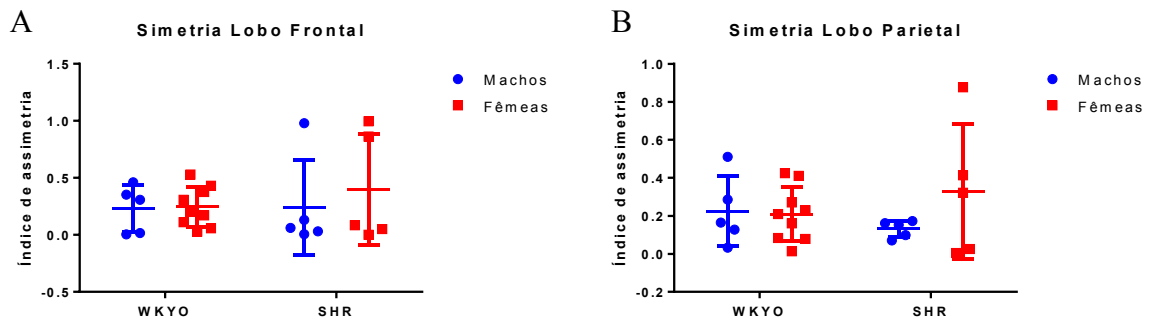


Figura 1. Análise do índice de assimetria interhemisférica da média de poder registrada no córtex frontal (A) e no córtex parietal (B). Os dados são representados por média \pm desvio padrão da média (n=5-9 animais avaliados por 4 eletrodos, sendo 2 eletrodos por hemisfério). Dados analisados por ANOVA de duas vias.

Theta

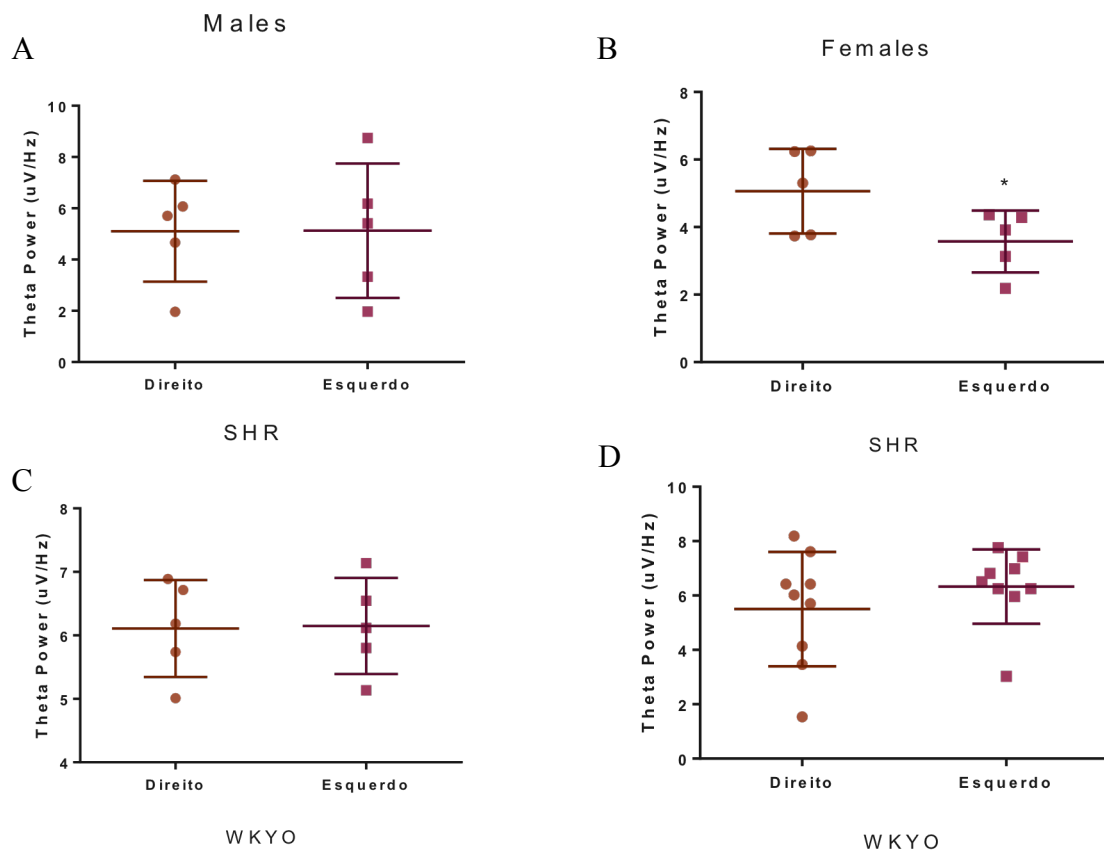


Figura 2. Análise das diferenças interhemisféricas de poder por banda de oscilação no córtex frontal. Banda Theta no córtex frontal nos animais SHR machos (A), SHR fêmeas (B), WKYO machos (C) e WKYO fêmeas (D).

(D). Os dados são representados por média \pm desvio padrão da média (n=5-9). Dados analisados por teste t de *student* pareado. *P<0,05, quando há diferença significativa entre o hemisfério direito e o hemisfério esquerdo.

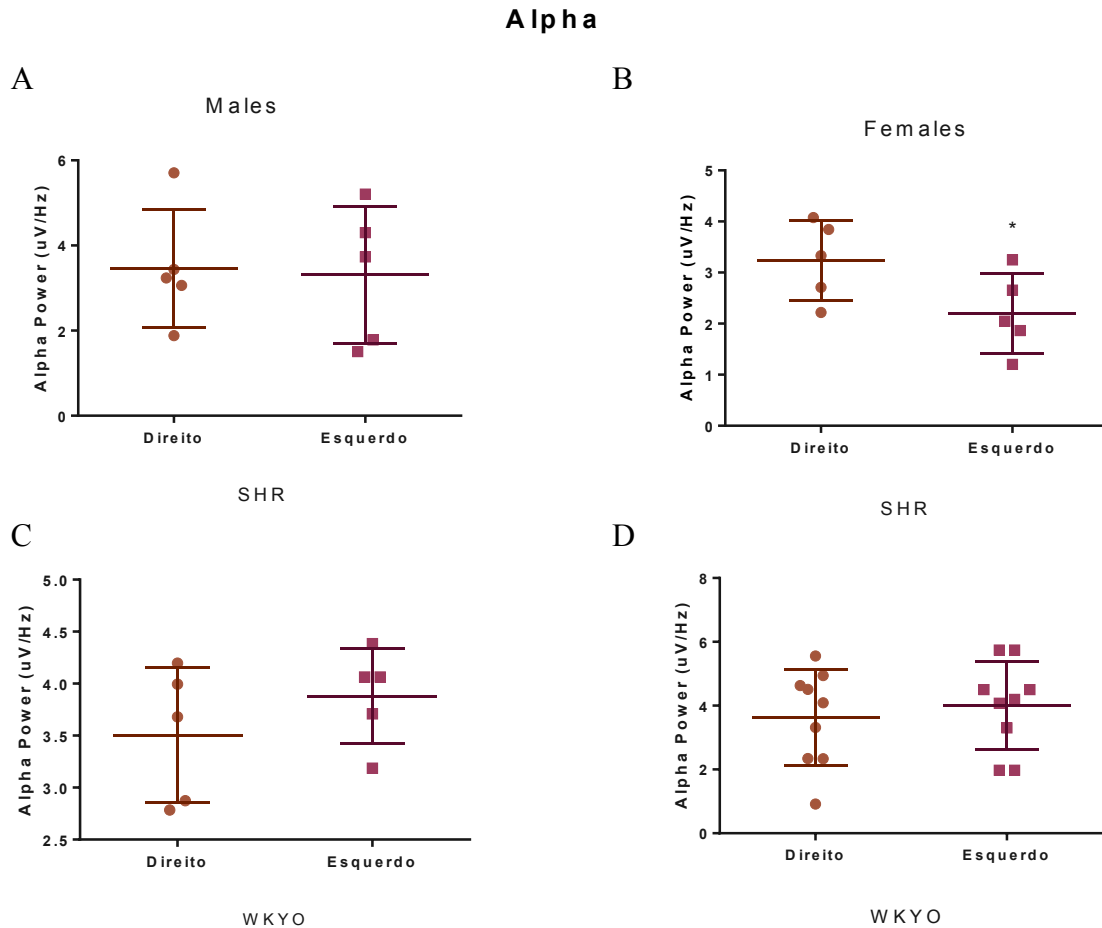


Figura 3. Análise das diferenças interhemisféricas de poder por banda de oscilação no córtex frontal. Banda Alfa no córtex frontal nos animais SHR machos (A), SHR fêmeas (B), WKYO machos (C) e WKYO fêmeas (D). Os dados são representados por média \pm desvio padrão da média (n=5-9). Dados analisados por teste t de *student* pareado. *P<0,05, quando há diferença significativa entre o hemisfério direito e o hemisfério esquerdo.

3.2 Alterações neuroquímicas

A análise através de ANOVA de duas vias do imunoconteúdo de proteínas no córtex frontal não revelou diferenças para o imunoconteúdo total (hemisfério direito e esquerdo) para NET, em relação à linhagem ($F_{(1,40)}=0,1675$; $P=0,6845$) e sexo ($F_{(1,40)}=1,590$; $P=0,2147$) (figura 4A), para DAT, em relação à linhagem ($F_{(1,40)}=1,869$; $P=0,1792$) e sexo ($F_{(1,40)}=4,047$; $P=0,0510$) (figura 4B), e para sinaptofisina, em relação à linhagem ($F_{(1,38)}=1,984$; $P=0,1671$) e sexo ($F_{(1,38)}=1,367$; $P=0,2496$) (figura 4C). Porém, na análise realizada por teste t de *student* pareado para diferenças interhemisféricas intragrupo, apesar de não serem verificadas

diferenças para NET nos animais SHR machos ($P=0,2453$; figura 5A) e SHR fêmeas ($P=0,7247$; figura 5B), os animais controle WKY machos apresentaram maior imunocontéudo no hemisfério direito ($P=0,0289$) (figura 5C). Para DAT, somente as fêmeas apresentaram diferenças interhemisféricas ($P=0,0440$; figura 6D), que não foram verificadas em SHR machos ($P=0,3773$; figura 6A) e SHR fêmeas ($P=0,6623$; figura 6B). Para a sinaptofisina, nenhum dos grupos apresentou diferenças entre o hemisfério direito e esquerdo (figura 7A-D).

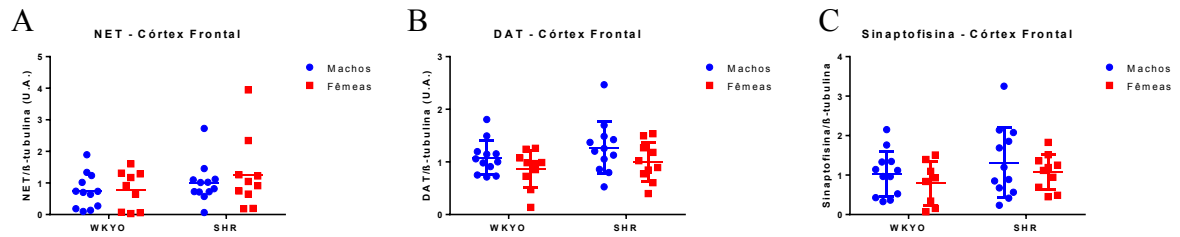


Figura 4. Análise do imunocontéudo total de NET (A), DAT (B) e sinaptofisina (C) no córtex frontal nos animais SHR machos, SHR fêmeas, WKYO machos e WKYO fêmeas. Os dados são representados por média \pm desvio padrão da média ($n=5-9$). Dados analisados por ANOVA de duas vias.

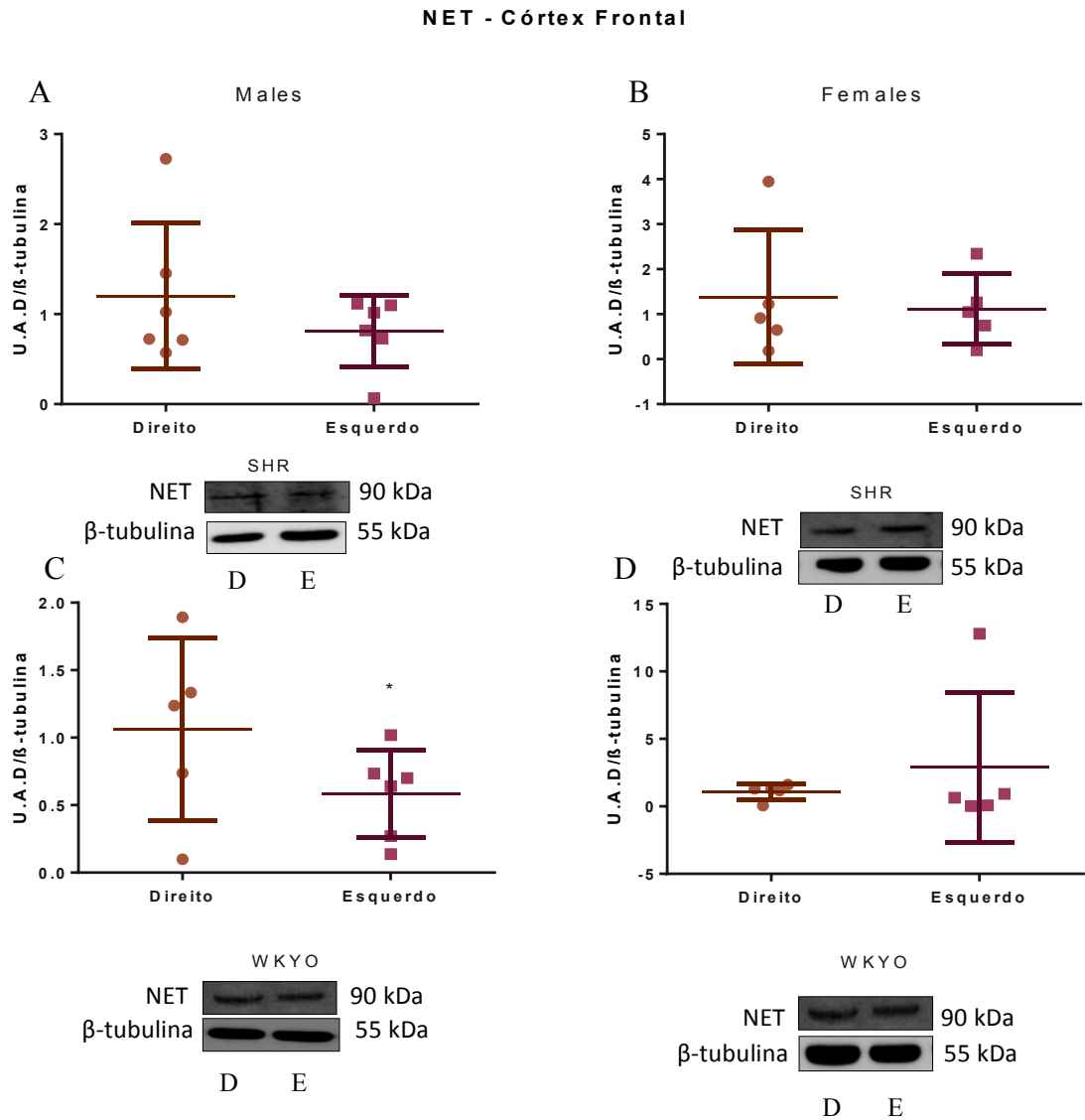


Figura 5. Análise das diferenças interhemisféricas no imunoconteúdo de NET no córtex frontal nos animais SHR machos (A), SHR fêmeas (B), WKYO machos (C) e WKYO fêmeas (D). Os dados são representados por média \pm desvio padrão da média (n=5-9). Dados analisados por teste t de *student* pareado. *P<0,05, quando há diferença significativa entre o hemisfério direito e o hemisfério esquerdo.

DAT - Córtex Frontal

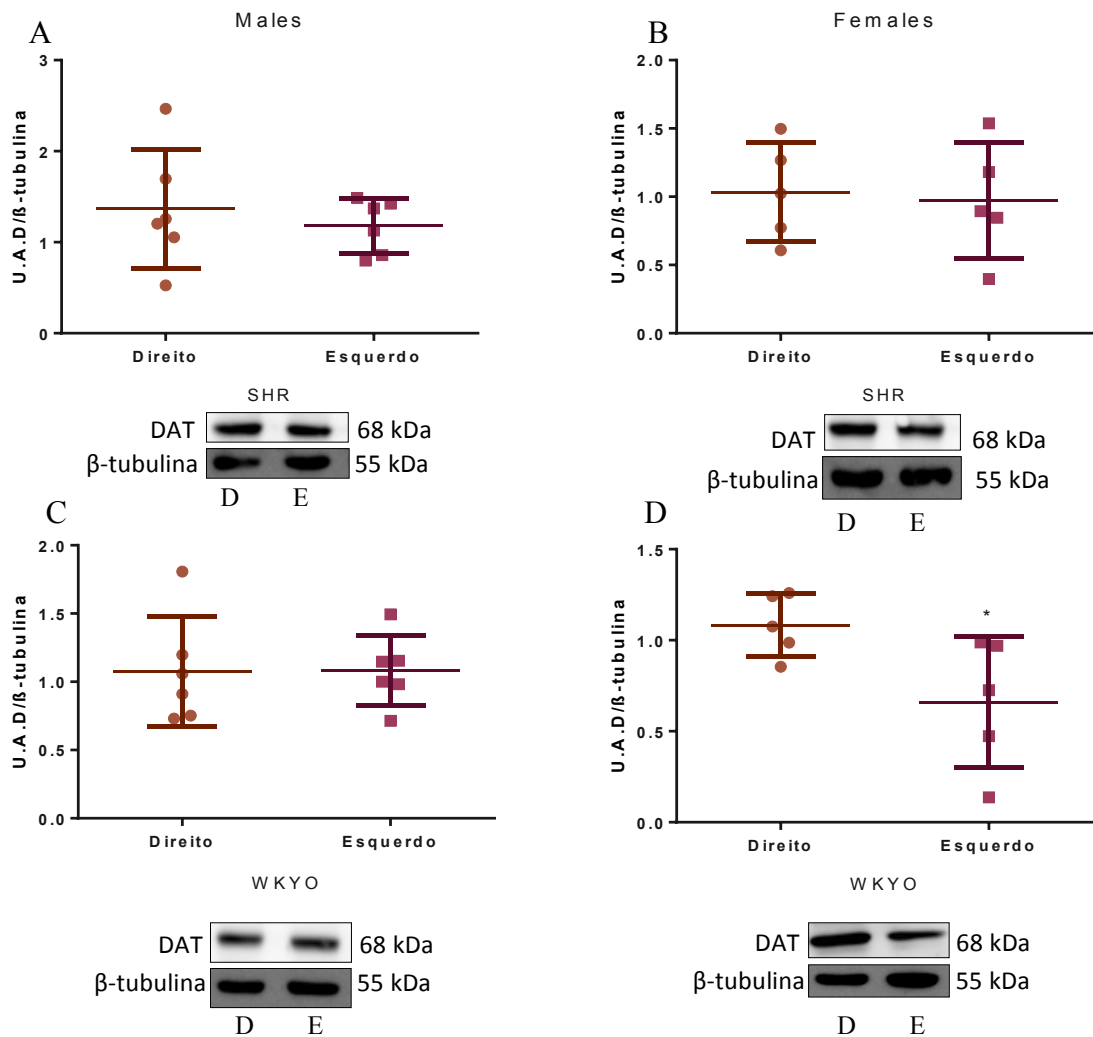


Figura 6. Análise das diferenças interhemisféricas no imunocônteuído de DAT no córtex frontal nos animais SHR machos (A), SHR fêmeas (B), WKYO machos (C) e WKYO fêmeas (D). Os dados são representados por média \pm desvio padrão da média (n=5-9). Dados analisados por teste t de *student* pareado. *P<0,05, quando há diferença significativa entre o hemisfério direito e o hemisfério esquerdo.

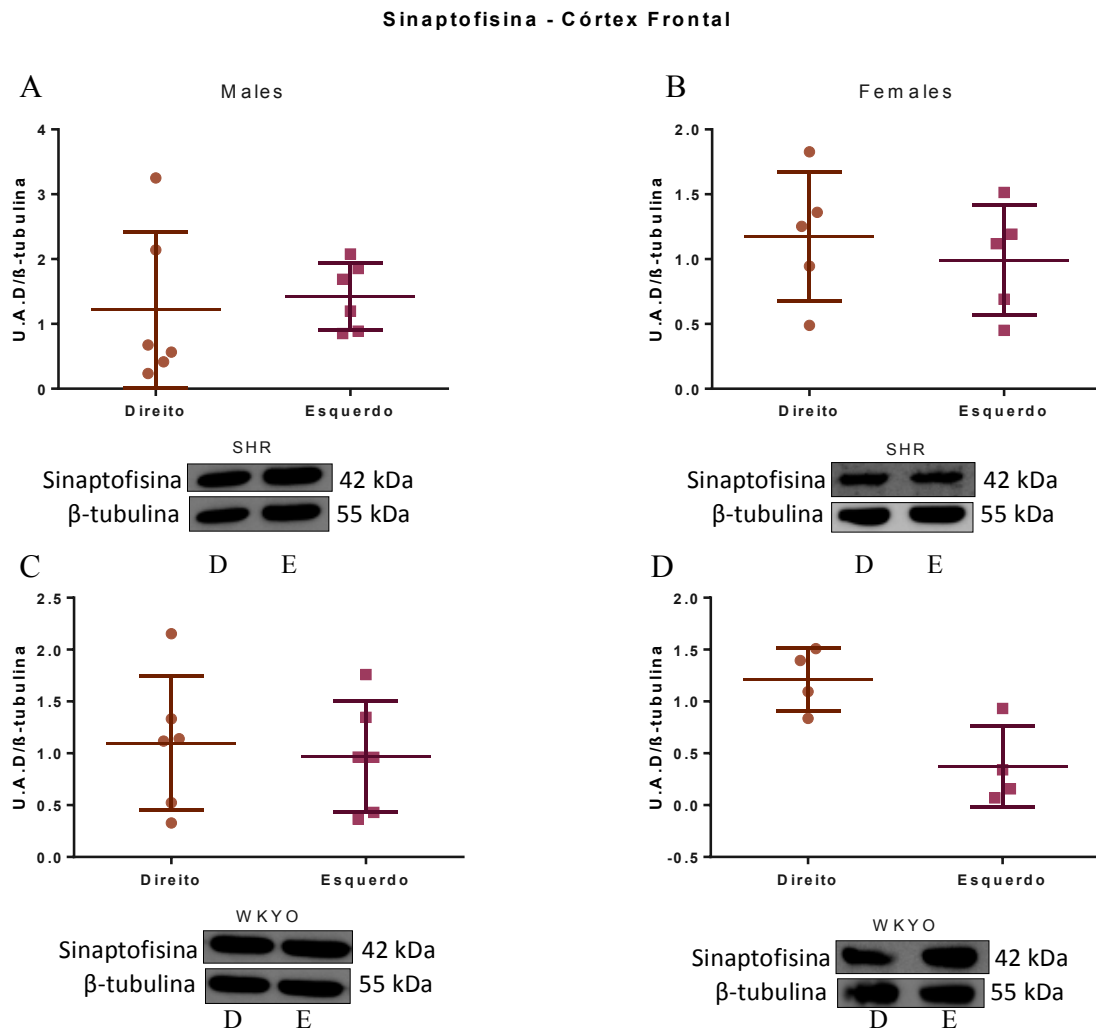


Figura 7. Análise das diferenças interhemisféricas no imunocontéudo de sinaptofisina no córtex frontal nos animais SHR machos (A), SHR fêmeas (B), WKYO machos (C) e WKYO fêmeas (D). Os dados são representados por média \pm desvio padrão da média (n=5-9). Dados analisados por teste t de *student* pareado.

4. Discussão

Neste estudo, animais machos e fêmeas do modelo animal mais estudado para o TDAH foram avaliados no EEG no período do final da adolescência. As fêmeas do modelo animal (SHR) apresentaram alterações assimétricas nas bandas de frequência theta e alfa no córtex frontal. Porém, não fomos capazes de associar tais alterações com mudanças assimétricas no córtex frontal ao imunocontéudo do transportador de noradrenalina, transportador de noradrenalina e sinaptofisina. É importante ressaltar que os resultados foram verificados no período do fim da adolescência dos animais, fase em que os SHR ainda não apresentam hipertensão arterial (Sagvolden et al., 2005), já que animais SHR adultos apresentam alterações no sistema nervoso que são associadas com a elevação da pressão

arterial, como redução da atividade basal da amígdala, habênula, núcleo interpeduncular e hipocampo, além de aumento da atividade em regiões associadas com o controle da pressão arterial, como hipotálamo e *locus coeruleus*, todas verificadas em relação à cepa WKY (Zubcevic et al., 2018). Assim, as alterações encontradas são representativas da cepa SHR no que diz respeito a sua validação como modelo animal do TDAH, e possivelmente não são referentes a complicações associadas à hipertensão arterial.

A assimetria frontal de ondas alfa verificada no EEG, que também pode ser citada como assimetria frontal, é amplamente utilizada em estudos de personalidade, temperamento, motivação, emoção, controle cognitivo e vários tipos de psicopatologias (Smith et al., 2017). No presente trabalho, as fêmeas SHR apresentaram maior poder de ondas alfa no lobo frontal direito em relação ao esquerdo, padrão associado a perturbações na motivação, que pode se apresentar como sintomas iniciais de depressão, e tendências de distanciamento de atividades sociais, que são características de transtornos de ansiedade (Meyer et al., 2015). Alperin et al (2019) recentemente avaliaram a assimetria frontal na banda alfa em adolescentes com TDAH verificando que, apesar de possivelmente caracterizar-se como um endofenótipo no transtorno, apresenta dependência de outros fatores, principalmente emocionais, cuja apresentação no TDAH é heterogênea. Na amostra avaliada pelos pesquisadores, os adolescentes que apresentavam maiores assimetrias frontais eram aqueles que relatavam baixos níveis de “afetividade negativa”, conceito que pode ser explicado pela experiência frequente de estresse emocional. Ademais, a assimetria frontal com maior poder de ondas alfa no hemisfério direito mostrou correlação com a severidade dos sintomas detectados nos sujeitos apenas nos casos em que era caracterizada inconsistência na disciplina parental, ou seja, baixos scores em um questionário que avalia o envolvimento dos pais com os filhos, o monitoramento das atividades, a consistência da realização dos itens anteriores e o uso de punição física (Essau et al., 2006). Portanto, assim como no estudo supracitado, nesse trabalho as assimetrias frontais das ondas alfa também não estiveram presentes em todos os animais modelo do TDAH, mas apenas nas fêmeas. As diferenças na apresentação podem residir na heterogeneidade de sintomas emocionais, que historicamente são menos investigados no TDAH do que os sintomas cognitivos (Alperin et al., 2019). Entretanto, Tsai et al (2019) avaliaram o comportamento do tipo ansioso na tarefa de campo aberto, em animais SHR machos, e verificaram que machos SHR demonstram menor comportamento ansioso nessa tarefa em relação à linhagem WKY. A mesma observação já foi feita através da utilização do labirinto em cruz elevado, no qual SHR machos tiveram maior número de entradas e maior proporção do tempo gasto nos braços abertos do aparato, achado que

apresenta correlação inversa com ansiedade (Durand et al., 1999). Além disso, parâmetros emocionais já foram avaliados em animais SHR adultos (hipertensos), que respondem de maneira exacerbada a estímulos estressantes (Martin et al., 2016), e apresentam até mesmo redução do comportamento do tipo ansioso na tarefa de campo aberto (Repova et al., 2019). Porém, o tratamento com Lisinopril, um anti-hipertensivo, reverteu as alterações encontradas, evidenciando que alterações comportamentais em animais SHR adultos não podem ser interpretadas sem considerar-se os impactos da hipertensão arterial sistêmica.

Assimetrias frontais na banda theta são associadas com processamento emocional, atenção, aprendizado e memória (Quraan et al., 2014). No TDAH, uma das anormalidades mais consistentes é o aumento do poder de ondas theta em regiões frontais e centrais do cérebro no EEG durante o repouso (Tye et al., 2014). No presente estudo, as alterações avaliadas foram de assimetria, sendo, portanto, complementares as evidências já publicadas. As fêmeas do modelo SHR apresentaram aumento do poder de ondas theta no hemisfério direito em relação ao esquerdo, padrão que, assim como para a banda alfa, está associado com sintomas de depressão (Kwon et al., 1996). Além disso, menor concordância no córtex frontal entre os hemisférios nas ondas theta esteve relacionado com menores reduções na severidade de sintomas em pacientes com transtorno de depressão maior resistentes à terapia medicamentosa que foram submetidos à tratamento por estimulação cerebral profunda por 24 semanas (Broadway et al., 2012). Nossos achados nas bandas alfa e theta em um modelo animal, estão em concordância com análises epidemiológicas que verificam que mulheres com TDAH têm maiores chances de desenvolver transtornos de ansiedade e depressão, considerados transtornos internalizantes, quando comparadas aos homens diagnosticados com o transtorno, que apresentam em maior proporção transtornos externalizantes (Williamson & Johnston, 2015), porém ainda é necessária a realização de testes comportamentais que possibilitem inferências sobre o estado emocional das fêmeas SHR.

Para associar as alterações de funcionalidade nos animais SHR com alterações em proteínas sinápticas, do sistema dopaminérgico e noradrenérgico, o imunocontéudo de sinaptofisina, DAT e NET foi avaliado no córtex frontal. A sinaptofisina é uma proteína marcadora de vesículas sinápticas que participa da regulação da liberação de neurotransmissores e da plasticidade sináptica, e que apresenta polimorfismos no gene SYP já documentados em associação com os sintomas do TDAH (Liu et al., 2013). O interesse no estudo das mutações em genes relacionados à processos sinápticos comuns a vários sistemas de neurotransmissores advém da ideia de que o TDAH tem origem em mais de um sistema e

nas suas interações (Liu et al., 2013). Os polimorfismos detectados acompanham especialmente o TDAH do subtipo desatento (Guan et al., 2009).

No presente estudo não foram verificadas alterações nos níveis do imunoconteúdo de sinaptofisina nos animais SHR em relação à linhagem controle WKY no córtex frontal. Ademais, os animais do modelo do TDAH não apresentaram diferenças interhemisféricas de imunoconteúdo. Sherwood et al (2010) demonstraram que chimpanzés apresentam assimetria no imunoconteúdo de sinaptofisina no córtex cerebral a nível populacional, especificamente no córtex motor primário, com maior imunoconteúdo no hemisfério direito em relação ao esquerdo. Os autores deixam clara a importância do estudo de correlatos microestruturais com assimetrias nas funções cognitivas e no comportamento, e especialmente a análise da sinaptofisina pode ser importante por detectar alterações gerais, que podem estar envolvidas com vários sistemas de neurotransmissores. Apesar disso, nesse trabalho os animais SHR apresentaram níveis similares aos animais controle, e não apresentaram assimetria de imunoconteúdo, e, portanto, esta proteína não parece explicar as assimetrias reveladas no EEG. Entretanto, vale ressaltar que as amostras coletadas de ambos os hemisférios não contém compartimentos isolados e purificados, tais como sinaptossomas (terminais nervosos isolados), e isto pode dificultar a possibilidade de encontrarmos alterações, considerando a importância desses métodos de isolamento para o estudo de mecanismos moleculares envolvidos em sinapses no sistema nervoso central (Evans, 2015).

O sistema dopaminérgico é o alvo mais comum no tratamento do TDAH, pois o metilfenidato, que é a farmacoterapia de primeira escolha, atua bloqueando o transportador de dopamina (DAT), e por consequência aumentando a disponibilidade e a ação da dopamina na fenda sináptica (Boix et al., 1998; Seixas et al., 2012). A fisiopatologia das alterações dopaminérgicas em desordens psiquiátricas apresenta conexão com a atividade do seu transportador (DAT) (Gowrishankar et al., 2014). A dopamina apresenta concentração e atividade assimétricas no sistema nervoso central mesmo em indivíduos saudáveis (Toga & Thompson, 2003; Nielsen et al., 1997). Mereu et al (2017) verificaram os impactos da hipofunção genética de DAT em camundongos heterozigotos DAT^{+/-} e encontraram um fenótipo hiperativo nos animais, além de déficits cognitivos que apresentaram melhora com a idade em animais machos, porém não nas fêmeas. Esse fenótipo foi consistente com os sintomas do TDAH, mas não de outras desordens que compartilham as alterações dopaminérgicas, como esquizofrenia e transtorno bipolar.

No presente trabalho, não foram verificadas alterações no imunoconteúdo de DAT nos animais SHR em relação à linhagem controle WKY no córtex frontal. Ainda, os animais do

modelo do TDAH não apresentaram diferenças de imunoconteúdo interhemisféricas. É possível que as diferenças totais de dopamina, e também as suas assimetrias, tanto na sua apresentação fisiológica quanto no TDAH, sejam mais significativas realizando-se a análise de outras proteínas desse sistema, como os receptores, e também mais aparentes em outras áreas do sistema nervoso, como o córtex estriado (Glick et al., 1982). Quando animais SHR e WKY são expostos à lesão unilateral no córtex estriado por injeção de 6-hidroxi-dopamina, com consequente depleção unilateral desse neurotransmissor nessa região, as maiores alterações são verificadas com lesões no hemisfério esquerdo dos animais, através da avaliação da atividade da enzima amino peptidase A, cujos substratos coexistem e/ou interagem com a dopamina. Em animais SHR, a lesão no hemisfério esquerdo esteve correlacionada com alterações da atividade dessa enzima no estriado e no córtex pré-frontal ipsilaterais, além de alterações no comportamento de rotação, enquanto nos animais WKY, a correlação encontrada caracterizou-se por lesão no hemisfério direito acompanhada de alterações contralaterais na atividade enzimática (Banegas et al., 2019). Ou seja, há diferenças na lateralidade do sistema dopaminérgico entre as linhagens, ao menos em situações patológicas, como na lesão causada por 6-hidroxi-dopamina.

Assim como a dopamina, a noradrenalina também apresenta alterações no TDAH (Russell, 2002), é alvo do tratamento farmacológico mesmo que não seja de primeira escolha (Seixas et al., 2012), e apresenta atividade assimétrica considerada fisiológica, cuja modificação está relacionada com a apresentação de transtornos (Glick et al., 1982). Por essas razões, o imunoconteúdo de NET também foi avaliado no córtex frontal dos animais, não apresentando alterações nos animais SHR em relação à linhagem controle WKY no córtex frontal, e também sem diferenças interhemisféricas nos animais do modelo do TDAH.

O transportador de noradrenalina também apresenta em comum com o transportador de dopamina a associação de polimorfismos em seus genes com sintomas do TDAH, e até mesmo com a resposta ao tratamento medicamentoso com metilfenidato, apesar de ser menos estudado que o sistema dopaminérgico (Angyal et al., 2018). A noradrenalina já teve assimetrias de função observadas em outras regiões que não o córtex frontal (Oke et al., 1980), sendo assim é possível que as assimetrias nesses dois sistemas de neurotransmissores sejam importantes de outras maneiras para a manifestação do TDAH. Entretanto, como para os dois sistemas de neurotransmissores existe uma assimetria que é considerada fisiológica e que é encontrada em indivíduos saudáveis, a ausência das mesmas nos animais SHR também pode caracterizar distúrbios no funcionamento do sistema nervoso central, uma vez que já é documentado que tanto a redução quanto o aumento de assimetrias podem apresentar-se em

transtornos psiquiátricos, aparecendo uma redução, especialmente no TDAH, quando avaliados parâmetros de conectividade na substância branca no cérebro (Li et al., 2019) e de estrutura (Shaw et al., 2009), sendo que esta última agrava-se ao longo do desenvolvimento dos pacientes. Em ambos os casos, os parâmetros foram avaliados através de estudos de neuroimagem.

5. Conclusão

No presente trabalho foram avaliadas as assimetrias interhemisféricas do ponto de vista funcional e neuroquímico no modelo animal mais estudado para o TDAH. As principais alterações funcionais avaliadas pelo EEG foram encontradas nas fêmeas do modelo animal, nas bandas theta e alfa no córtex frontal. Tais alterações são encontradas em pacientes com distúrbios emocionais frequentemente caracterizados como comorbidades do TDAH, o que reforça a importância da investigação em testes comportamentais, especialmente considerando o foco da maioria dos estudos na avaliação de parâmetros cognitivos em pacientes e modelos animais do TDAH. Apesar desses importantes achados funcionais, não foram encontradas alterações neuroquímicas assimétricas no córtex frontal que pudessem caracterizar-se como mecanismos responsáveis por tais manifestações, tornando essencial a continuação da avaliação de outros parâmetros e outros sistemas em relação às suas assimetrias neuroquímicas.

É importante levar em conta as limitações da utilização de modelos animais para o estudo de transtornos psiquiátricos, uma vez os animais SHR também apresentam características que os tornam candidatos para modelos animais de outros distúrbios.

6. Conflito de interesse

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

Referências

Alperin, B.R., Smith, C.J., Gustaffson, H.C., Figueras, M.T., Karalunas, S.L. (2019). The relationship between alpha asymmetry and ADHD depends on negative affect level and parenting practices. *Journal of Psychiatric Research*, 116 (6), 138-146.

- Angyal, N., Horvath, E.Z., Tarnok, Z., Richman, M.J., Bogнар, E., Lakatos, K., Sasvari-Szekely, M., Nemoda, Z. (2018). Association analysis of norepinephrine transporter polymorphisms and methylphenidate response in ADHD patients. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 84 (2), 122-128.
- Banegas, I., Segarra, A.B., Prieto, I., Vives, F., Gasparo, M., Duran, R., Luna, J.D., Ramirez-Sanchez, M. (2019). Asymmetrical response of aminopeptidase A in the medial prefrontal cortex and striatum of 6-OHDA-unilaterally-lesioned Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 182 (5), 12-21.
- Barbarese, W.J., Colligan, R.C., Weaver, A.L., Voigt, R.G., Killian, J.M., Katusic, S.K. (2013). Mortality, ADHD, and Psychosocial Adversity in Adults With Childhood ADHD: A Prospective Study. *Pediatrics*, 131 (4), 637-644.
- Biederman, J., Mick, E., Faraone, S.V., Braaten, E., Doyle, A., Spencer, T., Wilens, T.E., Frazier, E., Johnson, M.A. (2002). Influence of Gender on Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children Referred to a Psychiatric Clinic. *American Journal of Psychiatry*, 159 (1), 36-42.
- Boix, F., Qiao, S.W., Kolpus, T., Sagvolden, T. (1998). Chronic L-deprenyl treatment alters brain monoamine levels and reduces impulsiveness in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Behavioural Brain Research*, 94, 153-162.
- Broadway, J.M., Holtzheimer, P.E., Hilimire, M.R., Parks, N.A., DeVylder, J.E., Mayberg, H.S., Corballis, P.M. (2012). Frontal Theta Concordance Predicts 6-Month Antidepressant Response to Subcallosal Cingulate Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression: A Pilot Study. *Neuropsychopharmacology*, 37 (2), 1764-1772.
- Chabot, R.J., Orgill, A.A., Crawford, G., Michael, H., Gordon, S. (1999). Behavioral and electrophysiologic predictors of treatment response to stimulants in children with attention disorders. *Journal of Child Neurology*, 14 (6), 343-351.
- Curatolo, P., Paloscia, C., D'agati, E., Moavero, R., Pasini, A. (2009). The neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. *European Journal of Paediatric Neurology*, 13 (6), 299-304.
- Douglas, P.K., Gutman, B., Anderson, A., Larios, C., Lawrence, K.E., Narr, K., Sengupta, B., Cooray, G., Douglas, D.B., Thompson, P.M., McGough, J.J., Bookheimer, S.Y. (2018). Hemispheric brain asymmetry in youths with attention-deficit/hyperactivity disorder. *NeuroImage: Clinical*, 18 (2), 744-752.

- Durand, M., Berton, O., Aguerre, S., Edno, L., Comborieu, I., Mormède, P., Chaouloff, F. (1999). Effects of repeated fluoxetine on anxiety-related behaviours, central serotonergic systems, and the corticotropic axis in SHR and WKY rats. *Neuropharmacology*, 38, 893-907.
- Essau, C.A., Sosagawa, S., Frick, P.J. (2006). Psychometric Properties of the Alabama parenting Questionnaire. *Journal of Child and Family Studies*, 15 (5), 597-616.
- Evans, G.J.O. (2015). The Synaptosome as a Model System for Studying Synaptic Physiology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 5, 421-424.
- Faraone, S.V., Biederman, J. (1998). Neurobiology of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Society of Biological Psychiatry*, 44 (7), 951-958.
- Faraone, S.V., Biederman, J., Mick, E. (2005). The age-dependent decline of attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychological Medicine*, 36 (5), 159-165.
- Fuermaier, A.B.M., Tucha, L., Koerts, J., Weisbrod, M., Lange, K.W., Aschenbrenner, S., Tucha, O. (2017). Effects of methylphenidate on memory functions of adults with ADHD. *Applied Neuropsychology: Adult*, 24 (3), 199-211.
- Gaub, M., Carlson, C.L. (1997). Gender differences in ADHD: A meta-analysis and Critical Review. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 36 (8), 1036-1045.
- Glick, S.D., Ross, D.A., Hough, L.B. (1982). Lateral Asymmetry of Neurotransmitter in Human Brain. *Brain Research*, 234, 53-63.
- Gowrishankar, R., Hahn, M.K., Blakely, R.D. (2014). Good riddance to dopamine: Roles for the dopamine transporter in synaptic function and dopamine-associated brain disorders. *Neurochemistry International*, 73 (11), 42-28.
- Guan, L., Wang, B., Chen, Y., Li, J., Qian, Q., Wang, Z., Faraone, S.V., Wang, Y. (2009). A high-density single-nucleotide polymorphism screen of 23-candidates genes in attention deficit hyperactivity disorder: suggesting multiple susceptibility genes among Chinese Han population. *Molecular Psychiatry*, 14 (1), 545-554.
- Hart, H., Radua, J., Nakao, T., Mataix-Cols, D., Rubia, K. (2013). Meta-analysis of Functional Magnetic Resonance Studies of Inhibition and Attention in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *JAMA Psychiatry*, 70 (2), 185-198.
- Hynd, G.W., Hern, K.L., Novey, E.S., Eliopolus, D., Marshall, R., Gonzalez, J.J., Voeller, K.K. (1993). Attention-Deficit Hyperactivity Disorder and Asymmetry of the Caudate Nucleus. *Journal of Child Neurology*, 8 (10), 339-347.

- Kenemans, J.L., Bekker, E.M., Lijffijt, M., Overtom, C.C.E., Jonkman, L.M., Verbaten, M.N. (2005). Attention deficit and impulsivity: Selecting, Shifting, and stopping. *International Journal of Psychophysiology*, 58 (6), 59-70.
- Kwon, J.S., Youn, T., Jung, H.Y. (1996). Right hemisphere abnormalities in major depression: Quantitative electroencephalographic finding before and after treatment. *Journal of Affective Disorders*, 40 (6), 169-173.
- Lee, J.S., Kim, B.N., Kang, E., Lee, D.S., Kim, Y.K., Chung, J.K., Lee, M.C., Cho, S.C. (2005). Regional Cerebral Blood Flow in Children With Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Comparison Before and After Methylphenidate Treatment. *Human Brain Mapping*, 24 (2), 157-164.
- Leffa, D.T., Panzenhagen, A.C., Salvi, A.A., Bau, C.H.D., Pires, G.N., Torres, I.L.S., Rohde, L.A., Rovaris, D.L., Grevet, E.H. (2019). Systematic review and meta-analysis of the behavioral effects of methylphenidate in the spontaneously hypertensive rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 100, 166-179.
- Li, D., Li, T., Niu, Y., Xiang, J., Cao, R., Liu, B., Zhang, H., Wang, B. (2019). Reduced hemispheric asymmetry of brain anatomical networks in attention deficit hyperactivity disorder. *Brain Imaging and Behavior*, 13, 669-684.
- Liu, L., Chen, Y., Li, H., Qian, Q., Yang, L., Glatt, S.J., Faraone, S.V., Wang, Y. (2013). Association between SYP with attention-deficit/hyperactivity disorder in Chinese Han subjects: Differences among subtypes and genders. *Psychiatric Research*, 210, 308-314.
- Martin, E.J., Hernandez, M.E., Hayward, L.F. (2016). Blockade of orexin receptors attenuates the cardiovascular response to air-jet stress in spontaneously hypertensive rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 201, 8-16.
- Meneses, A., Perez-Garcia, G., Ponce-Lopes, T., Tellez, R., Gallegos-Cari, A., Castillo, C. (2011). Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: a short overview. *Reviews in the Neurosciences*, 22 (3), 365-371.
- Mereu, M., Contarini, G., Buonaguro, E.F., Latte, G., Manago, F., Lasevoli, F., Bartolomeis, A., Papaleo, F. (2017). *Neuropharmacology*, 121 (4), 179-194.
- Meyer, T., Smeets, T., Giesbrecht, T., Quaedflieg, C., Smulders, F., Meijer, E.H., Merckelbach, H. (2015). The role of frontal EEG asymmetry in post-traumatic stress disorder. *Biological Psychology*, 108, 62-77.

- Nielsen, D.M., Visker, K.E., Cunningham, M.J., Keller JR, R.W., Glick, S.D., Carlson, J.N. (1997). Paw Preference, Rotation, and Dopamine Function in Collins HI and LO Mouse Strains. *Physiology and Behavior*, 61 (4), 525-535.
- Oke, A., Lewis, R., Adams, R.N. (1980). Hemispheric asymmetry of norepinephrine distribution in rat thalamus. *Brain Research*, 188, 269-272.
- Polanczyk, G.V., Salum, G.A., Sugaya, L.S., Caye, A., Rohde, L.A. (2015). Annual Research Review: A meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 56 (3), 345-365.
- Quraan, M.A., Protzner, A.B., Daskalakis, Z.J., Giacobbe, P., Tang, C.W., Kennedy, S.H., Lozano, A.M., McAndrews, M.P. (2014). 39 (5), 1270-1281.
- Repova, K., Aziriova, S., Kovacova, D., Trubacova, S., Baka, T., Kanska, R., Barta, A., Stanko, P., Zorad, S., Molcan, L., Adamcova, M., Paulis, L., Simko, F. (2019). Lisinopril reverses behavioural alterations in spontaneously hypertensive rats. *General Physiology and Biophysics*, 38, 265-270.
- Russell, V.A. (2002). Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder – the spontaneously hypertensive rat. *Behavioural Brain Research*, 130 (1-2), 191-196.
- Sagvolden, T., Russell, V.A., Aase, H., Johansen, E.B., Farshbaf, M. (2005). Rodent Models of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biological Psychiatry*, 57 (11), 1239-1247.
- Sherwood, C.C., Duka, T., Stimpson, C.D., Schenker, N.M., Garrison, A.M., Schapiro, S.J., Baze, W.B., McArthur, M.J., Erwin, J.M., Hof, P.R., Hopkins, W.D. (2010). Neocortical Synaptophysin asymmetry and behavioral lateralization in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *European Journal of Neuroscience*, 31 (8), 1456-1464.
- Seixas, M., Weiss, M., Muller, U. (2012). Systematic review of national and international guideline on attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of Psychopharmacology*, 26 (6), 753-765.
- Shaw, P., Lalonde, F., Lepage, C., Rabin, C., Eckstrand, K., Sharp, W., Greenstein, D., Evans, A., Giedd, J.N., Rapoport, J. (2009). Development of Cortical Asymmetry in Typically Developing Children and Its Disruption in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Archives of General Psychiatry*, 66 (8), 888-896.
- Simchon, Y., Weizman, A., Rehavi, M. (2010). The effect of chronic methylphenidate administration on presynaptic dopaminergic parameters in a rat model for ADHD. *European Neuropsychopharmacology*, 20 (10), 714-720.

- Singh, I. (2008). Beyond polemics: science and ethics of ADHD. *Nature Reviews Neurology*, 9, 957-964.
- Smith, E.E., Reznik, S.J., Stewart, J.L., Allen, J.J.B. (2017). Assessing and Conceptualizing Frontal EEG Asymmetry: An Updated Primer on Recording, Processing, Analyzing, and Interpreting Frontal Alpha Asymmetry. *International Journal of Psychophysiology*, 111 (1), 98-114.
- Toga, A.W., Thompson, P.M. (2003). Mapping Brain Asymmetry. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 37-48.
- Tsai, M., Koslowska, A., Li, Y., Shen, W., Huang, A. (2017). Social factor affect motor and anxiety behaviors in the animal model of attention-deficit hyperactivity disorders: A housing style factor. *Psychiatry Research*, 254, 290-300.
- Tye, C., Rijdsdijk, F., McLoughlin, G. (2014). Genetic overlap between ADHD and EEG theta power. *Brain and Cognition*, 87 (3), 168-172.
- Williamson, D., Johnston, C. (2015). Gender differences in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: A narrative review. *Clinical Psychology Review*, 40 (5), 15-27.
- Zubcevic, J., Watkins, J., Perez, P.D., Colon-Perez, L.M., Long, M.T., Febo, M., Hayward, L. (2018). MEMRI reveal altered activity in brain regions associated with anxiety, locomotion and cardiovascular reactivity on the elevated plus maze in the WKY vs SHR rats. *Brain Imaging and Behavior*, 12, 1318-1331.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente trabalho foram avaliadas as assimetrias funcionais e neuroquímicas interhemisféricas no período do fim da adolescência no modelo animal mais validado para o estudo do TDAH. As principais alterações funcionais encontradas foram nas fêmeas do modelo do TDAH, com alterações nas bandas theta e alfa no córtex frontal. Porém, nenhum grupo apresentou diferenças nos índices de assimetria que comparam a média do poder total verificado pelos eletrodos em um hemisfério em relação ao outro. Apesar desses importantes achados funcionais, não foram encontradas alterações neuroquímicas assimétricas no córtex frontal para as proteínas DAT, NET e sinaptofisina.

A partir da análise dos dados obtidos, as principais perspectivas que surgem são o direcionamento de esforços para avaliar padrões de comportamento do tipo emocional no modelo animal SHR, já que as assimetrias funcionais encontradas nas fêmeas são frequentemente associadas a transtornos emocionais comumente apresentados como comorbidades do TDAH. Finalmente, é necessário dar continuidade na avaliação de assimetrias neuroquímicas no córtex frontal e em outras regiões do sistema nervoso desses animais, para que seja possível esclarecer quais mecanismos são associados ou até mesmo responsáveis pelas manifestações funcionais assimétricas.

REFERÊNCIAS

- American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing; 2013.
- ARNSTEN, Amy. The Emerging Neurobiology of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: The Key Role of the Prefrontal Association Cortex. **The Journal of Pediatrics**, v. 154, n. 5, p. 1-20, maio. 2009.
- BARBARESI, William et al. Mortality, ADHD, and Psychosocial Adversity in Adults with Childhood ADHD: A Prospective Study. **Pediatrics**, v.131, n.4, p. 637-644, abr. 2013.
- BIEDERMAN, Joseph et al. Influence of gender on Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children Referred to a Psychiatric Clinic. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, p. 36-42, 2002.
- BIEDERMAN, Joseph; NEWCORN, Jeffrey; SPRICH, Susan. Comorbidity of Attention Deficit Hyperactivity Disorder With Conduct, Depressive, Anxiety, and Other Disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 148, n.5, p. 564-577, maio. 1991.
- BOIX, Fernando et al. Chronic L-deprenyl treatment alters brain monoamine levels and reduce impulsiveness in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 94, p. 153-162, 1998.
- BUDILIN, Serg. Asymmetry in Dopamine Levels in the Nucleus Accumbens and Motor Preference in Rats. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 38, n. 9, p. 991-994, 2008.
- CHABOT, Robert et al. Behavioral and Electrophysiologic predictors of treatment response to stimulants in children with Attention Disorders. **Journal of Child Neurology**, v. 14, n. 6, p. 343-351, 1998.
- COAN, James; ALLEN, John. Frontal EEG asymmetry as a moderator and mediator of emotion. **Biological Psychology**, v. 67, p. 7-49, 2004.
- CURATOLO, Paolo et al. The neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 13, p. 299-304, 2009.
- DAVIDS, Eugen et al. Stereoselective effects of methylphenidate on motor hyperactivity in juvenile rats induced by neonatal 6-hydroxydopamine lesioning. **Psychopharmacology**, v. 160, n. 1, p. 92-98, fev. 2002.
- DOUGLAS, Pamelita et al. Hemispheric brain asymmetry differences in youths with attention-deficit/hyperactivity disorder. **NeuroImage: Clinical**, v. 18, p. 744-752, fev. 2018.
- DUBOC, Véronique et al. Asymmetry of the Brain: Development and Implications. **Annual Review of Genetics**, v. 49, p. 647-672, out. 2015.
- FARAONE, Stephen; BIEDERMAN, Joseph. Neurobiology of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. **Society of Biological Psychiatry**, v. 44, p. 951-958, jul. 1998.
- FARAONE, Stephen; BIEDERMAN, Joseph; MICK, Eric. The age dependent decline of

attention deficit hyperactivity disorder: a meta analysis of follow-up studies. **Psychological Medicine**, v. 36, p. 159-165, 2006.

FUERMAIER, Anselm et al. Effects of Methylphenidate on memory functions of adults with ADHD. **Applied Neuropsychology: Adult**, v. 24, n. 3, p. 199-211, 2017.

GAUB, Miranda; CARLSON, Caryn L. Gender differences in ADHD: A meta-analysis and Critical Review. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 36, n. 8, p. 1036-1045, 1997.

GAZANIGGA, Michael; BOGEN, Joseph; SPERRY, Roger. Some functional effects of sectioning the cerebral commissures in man. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 48, n. 10, p. 1765-1769, 1962.

GERSHON, Jonathan. A Meta-Analytic Review of Gender Differences in ADHD. **Journal of Attention Disorders**, v. 5, n. 3, p. 143-154, jan. 2002.

GLICK, Stanley; ROSS, David; HOUGH, Lindsay. Lateral Asymmetry of Neurotransmitters in Human Brain. **Brain Research**, v. 234, p. 53-63, jul. 1982.

GUADALUPE, Tulio et al. Asymmetry within and around the human planum temporale is sexually dimorphic and influenced by genes involved in steroid hormone receptors activity. **Cortex**, v. 62, p. 41-55, 2015.

HART, Heledd et al. Meta-analysis of Functional Magnetic Resonance Imaging Studies of Inhibition and Attention in Attention-deficit/Hyperactivity Disorder. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 2, p. 185-198, fev. 2013.

HIRNSTEIN, Marco; HUGDAHL, Kenneth; Hausmann, Markus. Cognitive sex differences and hemispheric asymmetry: A critical review of 40 years of research. **Laterality: Asymmetries of Body, Brain and Cognition**, v. 24, n. 2, p. 204-252, jun. 2019.

HOOGMAN, Martine et al. Subcortical brain volume differences of participants with ADHD across the lifespan: an ENIGMA collaboration. **Lancet Psychiatry**, v. 4, n. 4, p. 310-319, abr. 2017.

HYND, GW et al. Attention-Deficit Hyperactivity Disorder and asymmetry of the caudate nucleus. **Journal of Child Neurology**, v. 8, p. 339-347, 1993.

KAWAKAMI, Ryosuke et al. Asymmetrical Allocation of NMDA Receptor epsilon 2 subunits in hippocampal circuitry. **Science**, v. 300, n. 5621, p. 990-994, maio 2003.

KENEMANS, JL. et al. Attention deficit and impulsivity: Selecting, shifting, and stopping. **International Journal of Psychophysiology**, v. 58, p. 59-70, 2005.

KIELING, Renata; ROHDE, Luis. ADHD in children and adults: diagnosis and prognosis. **Current Topics in Behavioral Neuroscience**, v. 9, p. 1-16, 2012.

LEE, Jae Sung et al. Regional Cerebral Blood Flow in children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Comparison before and after Methylphenidate treatment. **Human Brain Mapping**, v. 24, p. 157-164, 2005.

LEFFA, Douglas et al. Systematic review and meta-analysis of the behavioral effects of methylphenidate in the spontaneously hypertensive rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 100, p. 166-179, 2019.

LEUCHT, Stefan. et al. Putting the efficacy of psychiatric and general medicine medication into perspective: review of meta-analyses. **The British Journal of psychiatry**, v. 200, n. 2, p. 97-106, fev. 2012.

LI, Dandan et al. Reduced hemispheric asymmetry of brain anatomical networks in attention deficit hyperactivity disorder. **Brain Imaging and Behavior**, v. 13, p. 669-684, maio. 2011.

MALONE, Molly; KERSHNER, John; SWANSON, James. Hemispheric processing and Methylphenidate effects in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. **Journal of Child Neurology**, v. 9, p. 181-189, 1993.

MEFFORD, I.N.; POTTER, W.Z. A Neuroanatomical and Biochemical Basis for Attention Deficit Disorder with Hyperactivity in Children: A Defect in Tonic Adrenaline Mediated Inhibition of Locus Coeruleus Stimulation. **Medical Hypothesis**, v. 29, p. 33-42, 1989.

MENESES, Alfredo et al. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: a short overview. **Reviews Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 365-371, 2011.

MEYER, Thomas et al. The role of frontal EEG asymmetry in post-traumatic stress disorder. **Biological Psychology**, v. 108, p. 62-77, 2015.

NIELSEN, Darci et al. Paw Preference, Rotation, and Dopamine Function in Collins HI and LO Mouse Strains. **Physiology & Behavior**, v. 61, n. 4, p. 525-535, 1997.

OKE, Arvin; LEWIS, Ramilla; ADAMS, Ralph. Hemispheric asymmetry of norepinephrine distribution in rat thalamus. **Brain Research**, v. 188, p. 269-272, 1980.

PALMA, Sonia; NATALE, Ana Carolina; CALIL, Helena. A 4-year follow-up study of attention-deficit hyperactivity symptoms, comorbidities, and psychostimulant use in a Brazilian sample of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, n. 135, p. 1-6, out. 2015.

PANZICA, GianCarlo; MELCANGI, Roberto. Structural and molecular brain sexual differences: A tool to understand sex differences in health and disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 67, p. 2-8, 2016.

POLANCZYK, Guilherme V. et al. Annual Research Review: A meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. **The Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 56, n. 3, p. 345-365, 2015.

PROVERBIO, Alice et al. Face Coding is Bilateral in the Female Brain. **PLOS ONE**, v. 5, n. 6, p. 1-7, jun. 2010.

PURPER-OUAKIL, Diane et al. Neurobiology of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. **Pediatric Research**, v. 69, n. 5, p. 69-76, 2011.

QURAAN, Maher et al. EEG Power Asymmetry and Functional Connectivity as a Marker of

Treatment Effectiveness in DBS Surgery for Depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, p. 1270-1281, 2014.

ROHDE, Luis. Is There a Need to Reformulate Attention Deficit Hyperactivity Disorder Criteria in Future Nosologic Classifications? **Child and Adolescents Psychiatric Clinics of North America**, v. 17, p. 405-420, 2008.

RUSSELL, Vivienne. Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder – the spontaneously hypertensive rat. **Behavioural Brain Research**, v. 130, p. 191-196, 2002.

SAFREN, Steven et al. Cognitive Behavioral Therapy vs Relaxation With Educational Support for Medication-Treated Adults With ADHD and Persistent Symptoms: A Randomized Controlled Trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 304, n. 8, p. 875-880, ago. 2010.

SAGVOLDEN, Terje et al. Rodent models of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1239-1247, 2005.

SEIXAS, Miguel; WEISS, Margaret; MULLER, Ulrich. Systematic review of national and international guidelines on attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 6, p. 753-765, 2012.

SHANSKY, Rebecca; WOOLLEY, Catherine. Considering Sex as a Biological Variable Will Be Valuable for Neuroscience Research. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 47, p. 11817-11822, ago. 2016.

SHAW, Philip et al. Development of Cortical Asymmetry in Typically Developing Children and Its Disruption in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 66, n. 8, p. 888-896, ago. 2009.

SIMCHON, Y; WEIZMAN, A; REHAVI, M. The effect of chronic methylphenidate administration on presynaptic dopaminergic parameters in a rat model for ADHD. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, p. 714-720, 2010.

SINGH, Ilina. Beyond polemics: science and ethics of ADHD. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 957-964, 2008.

SKODZIK, Timo; HOLLING, Heinz; PEDERSON, Anya. Long-Term Memory Performance in Adult ADHD: A Meta-Analysis. **Journal of Attention Disorders**, v. 21, n. 4, p. 267-283, 2017.

SMITH, Ezra et al. Assessing and Conceptualizing Frontal EEG Asymmetry: An Updated Primer on Recording, Processing, Analyzing, and Interpreting Frontal Alpha Asymmetry. **International Journal of Psychophysiology**, v. 111, p. 98-114, jan. 2017.

SOLANTO, Mary et al. Efficacy of Meta-Cognitive Therapy (MCT) for adult ADHD. **American Journal of Psychiatry**, v. 167, n. 8, p. 958-968, ago. 2010.

SON, Gi Hoon et al. Hyperactivity and alterations of the midbrain dopaminergic system in maternally stressed male mice offspring. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, p. 823-829, 2007.

SONTAG, Thomas et al. Animal models of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a critical review. **ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders**, v. 2, p. 1-20, 2010.

SPENCER, Thomas; BIEDERMAN, Joseph, MICK, Eric. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Diagnosis, Lifespan, Comorbidities, and Neurobiology. **Ambulatory Pediatrics**, v. 7, n. 1S, p. 73-81, fev. 2007.

STEVENS, Jennifer; Hamann, Stephan. Sex differences in brain activation to emotional stimuli: A meta-analysis of neuroimaging studies. **Neuropsychologia**, v. 50, p. 1578-1593, 2012.

TOGA, Arthur; Thompson, Paul. Mapping Brain Asymmetry. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 37-48, jan. 2003.

WEBER, Peter. Unilateral or Asymmetric Localization of Lambda Waves Is Not a Pathologic Finding. **Journal of Child Neurology**, v. 20, n. 3, p. 250-251, mar. 2005.

WILENS, Timothy; MORRISON, Nicholas; PRINCE, Jefferson. An update on the pharmacotherapy of attention-deficit/hyperactivity disorder in adults. **Expert Review Neurotherapeutics**, v.11, n. 10, p. 1443-1465, out. 2011.

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

WITELSON, SF. The brain connection: the corpus callosum is larger in left-handers. **Science**, v. 229, n. 4714, p. 665-668, ago. 1985.

World Health Organization. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. *Int Classif.* 1992; 10: 1-267.

**ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA LATERALITY:
ASYMMETRIES OF BODY, BRAIN AND COGNITION**

Preparing Your Paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

Format-Free Submission

Authors may submit their paper in any scholarly format or layout. Manuscripts may be supplied as single or multiple files. These can be Word, rich text format (rtf), open document format (odt), or PDF files. Figures and tables can be placed within the text or submitted as separate documents. Figures should be of sufficient resolution to enable refereeing.

- There are no strict formatting requirements, but all manuscripts must contain the essential elements needed to evaluate a manuscript: abstract, author affiliation, figures, tables, funder information, and references. Further details may be requested upon acceptance.
- References can be in any style or format, so long as a consistent scholarly citation format is applied. Author name(s), journal or book title, article or chapter title, year of publication, volume and issue (where appropriate) and page numbers are essential. All bibliographic entries must contain a corresponding in-text citation. The addition of DOI (Digital Object Identifier) numbers is recommended but not essential.
- The journal reference style will be applied to the paper post-acceptance by Taylor & Francis.
- Spelling can be US or UK English so long as usage is consistent.

Note that, regardless of the file format of the original submission, an editable version of the article must be supplied at the revision stage.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, [visit this website](#).

Checklist: What to Include

1. **Author details.** Please ensure everyone meeting the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [requirements for authorship](#) is included as an author of your paper. All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).
2. Should contain an unstructured abstract of 50-200 words.
3. You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming](#).
4. Between 1 and 5 **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.
5. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:
For single agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].
For multiple agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].
6. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it](#).
7. **Data availability statement.** If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.
8. **Data deposition.** If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
9. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, dataset, filesset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article](#).

10. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.
11. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.
12. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).
13. **Units.** Please use [SI units](#) (non-italicized).

Using Third-Party Material in your Paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

Disclosure Statement

Please include a disclosure statement, using the subheading “Disclosure of interest.” If you have no interests to declare, please state this (suggested wording: *The authors report no conflict of interest*). For all NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the declaration of interest statement. [Read more on declaring conflicts of interest](#).

Clinical Trials Registry

In order to be published in a Taylor & Francis journal, all clinical trials must have been registered in a public repository at the beginning of the research process (prior to patient enrolment). Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details in the methods section. The registry should be publicly accessible (at no charge), open to all prospective registrants, and managed by a not-for-profit organization. For a list of registries that meet these requirements, please visit the [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#) (ICTRP). The registration of all clinical trials facilitates the sharing of information among clinicians, researchers, and patients, enhances public confidence in research, and is in accordance with the [ICMJE guidelines](#).

Complying With Ethics of Experimentation

Please ensure that all research reported in submitted papers has been conducted in an ethical and responsible manner, and is in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All papers which report in vivo experiments or clinical trials on humans or animals must include a written statement in the Methods section. This should explain that all

work was conducted with the formal approval of the local human subject or animal care committees (institutional and national), and that clinical trials have been registered as legislation requires. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study follows the principles of the [Declaration of Helsinki](#).

Consent

All authors are required to follow the [ICMJE requirements](#) on privacy and informed consent from patients and study participants. Please confirm that any patient, service user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any research, experiment, or clinical trial described in your paper has given written consent to the inclusion of material pertaining to themselves, that they acknowledge that they cannot be identified via the paper; and that you have fully anonymized them. Where someone is deceased, please ensure you have written consent from the family or estate. Authors may use this [Patient Consent Form](#), which should be completed, saved, and sent to the journal if requested.

Health and Safety

Please confirm that all mandatory laboratory health and safety procedures have been complied with in the course of conducting any experimental work reported in your paper. Please ensure your paper contains all appropriate warnings on any hazards that may be involved in carrying out the experiments or procedures you have described, or that may be involved in instructions, materials, or formulae.

Please include all relevant safety precautions; and cite any accepted standard or code of practice. Authors working in animal science may find it useful to consult the [International Association of Veterinary Editors' Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare](#) and [Guidelines for the Treatment of Animals in Behavioural Research and Teaching](#). When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in your paper, please specify this, or that the product is still investigational.

Submitting Your Paper

This journal uses ScholarOne Manuscripts to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in ScholarOne. Please read the guidelines above and then submit your paper in [the relevant Author Centre](#), where you will find user guides and a helpdesk.

Please note that *Laterality: Asymmetries of Body, Brain and Cognition* uses [Crossref™](#) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Laterality: Asymmetries of Body, Brain and Cognition* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about [sharing your work](#).

Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information](#) regarding repositories.

Authors are further encouraged to [cite any data sets referenced](#) in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

Publication Charges

There are no submission fees, publication fees or page charges for this journal.

Colour figures will be reproduced in colour in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply.

Charges for colour figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements](#).

Complying with Funding Agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access

policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about [sharing your work](#).

Open Access

This journal gives authors the option to publish open access via our [Open Select publishing program](#), making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check [open access funder policies and mandates here](#).

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our [Author Services website](#).

For more information on license options, embargo periods and APCs for this journal please go [here](#).

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

Article Reprints

You will be sent a link to order article reprints via your account in our production system. For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk. You can also [order print copies of the journal issue in which your article appears](#).