

UNIVERSIDADE PAULISTA

LOREN DA SILVA MEDEIROS

**A MUTAÇÃO EM CAMUNDONGOS DO GENE KM2D INDUZ
COMPORTAMENTOS COMPATÍVEIS COM MODELOS
ANIMAIS DE TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E
HIPERATIVIDADE EM MACHOS, MAS NÃO EM FÊMEAS**

SÃO PAULO

2024

LOREN DA SILVA MEDEIROS

**A MUTAÇÃO EM CAMUNDONGOS DO GENE KM2D INDUZ
COMPORTAMENTOS COMPATÍVEIS COM MODELOS
ANIMAIS DE TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E
HIPERATIVIDADE EM MACHOS, MAS NÃO EM FÊMEAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi

SÃO PAULO

2024

Medeiros, Loren da Silva.

A mutação em camundongos do gene Km2d induz comportamentos compatíveis com modelos animais de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade em machos, mas não em fêmeas / Loren da Silva Medeiros. - 2024.

69 f. : il. color.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2024.

Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva.

1. Mutação. 2. N-ethyl-N-nitrosourea. 3. Comportamento.
4. Epigenética. 5. Hiperatividade. I. Bernardi, Maria Martha (orientadora).
II. Silva, Rodrigo Augusto da (Coorientador). III. Título.

LOREN DA SILVA MEDEIROS

**A MUTAÇÃO EM CAMUNDONGOS DO GENE KM2D INDUZ
COMPORTAMENTOS COMPATÍVEIS COM MODELOS
ANIMAIS DE TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E
HIPERATIVIDADE EM MACHOS, MAS NÃO EM FÊMEAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovada em: ___/___/___

_____ Julgamento: _____

Prof.a. Dra. Maria Martha Bernardi – UNIP

_____ Julgamento: _____

Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva- UNIP

_____ Julgamento: _____

Prof.a. Dra Ivana Barbosa Suffredini – UNIP

_____ Julgamento: _____

Prof. Dra. Esther Lopes Ricci Adari Camargo - Mackenzie

_____ Julgamento: _____

Prof. Dra. Elizabeth Teodorov – USP

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES/PROSUP)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por todas as oportunidades e sempre me capacitar nessa trajetória

Gostaria de agradecer a minha orientadora Maria Martha, que me acolheu como aluna de iniciação científica e me incentivou a continuar com o mestrado e agora no doutorado, que sempre me incentivou e inspirou.

Agradecer aos meus Pais, Thatiane e Waldemar, que são minhas pilstras da vida por sempre me incentivarem a buscar meus sonhos e objetivos, acreditando e me apoiando em todos os meus sonhos.

Agradecer ao meu amor, Ricardo, por todo o companheirismo nesses anos e por me dar o melhor presente, nosso pequeno, Matheus.

E gostaria de agradecer a todos que colaboraram com esse trabalho, o Prof. Rodrigo Augusto, a Dra. Ana Claudia Sampaio, Ao Ms Alex Rodrigues e as iniciações científicas Cassia, Tais e Gabriel, sem a dedicação de esse trabalho não daria certo.

RESUMO

Medeiros, L.S. **A mutação em camundongos do gene Km2d induz comportamentos compatíveis com modelos animais de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade em machos mas não em fêmeas.** Qualificação de tese em nível de doutorado (Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2023. Orientação: Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

Introdução: O camundongo mutante recessivo bate-palmas BALB/c *bapa* apresenta mutação no gene Km2d. Em humanos a mutação deste gene está ligada a ocorrência da síndrome de Kabuki. Pacientes com esta síndrome apresentam hiperatividade e impulsividade com sintomas similares ao transtorno de déficit de atenção. Além disso, estudos prévios que caracterizaram o fenótipo deste mutante revelaram, além de outros aspectos, que eles apresentam aumento da atividade geral. **Objetivos:** Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o camundongo *bapa* apresenta comportamentos compatíveis com hiperatividade, déficit de atenção e impulsividade. **Material e Métodos:** Foram observados: a atividade geral em campo aberto, comportamentos de autolimpeza, no labirinto em Y, no teste de atenção baseado em objetos, no teste de esquiva de altura de camundongos BALB/c(grupo selvagem-WT) e *bapa*, machos e fêmeas. A expressão dos receptores da adenosina (ADORA 1 e 2) foi avaliada. **Resultados:** Em relação aos camundongos WT, os camundongos *bapa* machos apresentaram: aumento da atividade geral e da limpeza; redução na porcentagem de alternâncias em labirinto em Y e no teste de atenção a objetos, sem modificações no teste de impulsividade e aumento na expressão do receptor ADORA 2. As fêmeas *bapa* mostraram: redução na atividade geral e na limpeza; aumento nas frequência de alternâncias em labirinto em Y e no teste de atenção a objetos novos, com ausência de comportamento de risco e redução na expressão do receptor ADORA 2. **Conclusões:** Estes resultados sugerem que a mutação do gene Km2d afetou de forma diferente o comportamento de camundongos machos e fêmeas mutantes, provavelmente por alterações epigenéticas ligadas aos hormônios sexuais .

Palavras-chave :mutação; N-ethyl-N-nitrosourea; comportamento; epigenética;hiperatividade.

ABSTRACT

Medeiros, L.S. Mutation in mice of the Km2d gene induces behaviors compatible with animal models of attention deficit hyperactivity disorder in males but not in females. Qualification of thesis at the doctoral level (Environmental and Experimental Pathology) - Universidade Paulista, São Paulo, 2023. Supervision: Profa. Dr. Maria Martha Bernardi

Introduction: The BALB/c bapa recessive mutant mouse presents a mutation in the Km2d gene. In humans, the mutation of this gene is linked to the occurrence of Kabuki syndrome. Patients with this syndrome present hyperactivity and impulsivity with symptoms similar to attention deficit disorder. Furthermore, previous studies that characterized the phenotype of this mutant revealed, among other aspects, that they present increased general activity. **Objectives:** Therefore, this work aimed to evaluate whether the bapa mouse presents behaviors compatible with hyperactivity, attention deficit, and impulsivity. **Material and Methods:** The following were observed: general activity in the open field, self-grooming behaviors, in the Y-maze, in the object-based attention test, in the height avoidance test of BALB/c mice (wild-type-WT group) and bapa, males, and females. The expression of adenosine receptors (ADORA 1 and 2) was evaluated. **Results:** Compared to WT mice, male bapa mice showed increased general activity and grooming, a reduction in the percentage of alternations in the Y-maze and the attention to objects test, without changes in the impulsivity test and an increase in the expression of the ADORA 2 receptor. Bapa females showed a reduction in general activity and grooming, an increase in the frequency of alternations in the Y-maze and the test of attention to new objects, with an absence of risky behavior and a reduction in the expression of the ADORA 2 receptor. **Conclusions:** These results suggest that the Km2d gene mutation affected the behavior of male and female mutant mice differently, probably due to epigenetic changes linked to sex hormones.

Keywords: mutation; N-ethyl-N-nitrosourea; behavior; epigenetics; immunohistochemistry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
1.1 Modelos experimentais em pesquisa	11
1.2 O camundongo <i>bapa</i>	17
1.3 <i>KMT2D</i> e modificações de cromatina.....	20
1.4 Sobre o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.....	22
1.5 Modelos animais de TDHA.....	27
2. OBJETIVO GERAL	28
2.1. Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Ética.....	29
3.2. Animais.....	29
3.3. Delineamento experimental	29
3.4.Procedimentos	30
3.4.1.Atividade geral em campo aberto.....	30
3.4.2.Comportamento de autolimpeza.....	31
3.4.3.Teste do labirinto em Y.	32
3.4.4.Teste de atenção baseado em objetos (OBAT).....	33
3.4.5. Teste de esquiva da altura	34
3.4.6. Estudos moleculares	35
3.4.6.1. Extração de Ácido Ribonucleico (RNA) total	35
3.4.6.2.Síntese de DNA complementar (cDNA).....	35
3.4.6.3.Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (q-PCR).....	36
3.5. Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1.Atividade geral em campo aberto.....	38
4.2. Comportamento de autolimpeza.....	39
4.3. Teste de alternância em labirinto em Y	39
4.4. Teste de atenção baseado em objetos (OBAT	40
4.5. Teste de esquiva da altura	41
4.6. Expressão dos receptores ADORA 1 e ADORA 2 em camundongos machos WT e <i>bapa</i>	42
4.7. Atividade geral em campo aberto.....	44

4.8. Comportamento de autolimpeza.....	45
4.9. Teste de alternância em labirinto em Y	45
4.10. Teste de atenção baseado em objetos (OBAT) de camundongos machos WT e bapa.....	46
4.11. Teste de esquiva da altura	47
4.12. Expressão dos receptores ADORA 1 e ADORA 2 em fêmeas.	48
5. DISCUSSÃO	50
6. REFERENCIAS	58
7. ANEXO 1- COMPROVANTE DA CEUA	69

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nesta seção são abordados os modelos animais em pesquisa enfocando, em particular, os modelos animais produzidos geneticamente. A seguir, são descritas as características do camundongo bapa e do gene KMT2D e suas modificações de cromatina com relação a doenças humanas. Devido aos objetivos do trabalho, foi feita uma revisão das características principais do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.

1.1 Modelos experimentais em pesquisa

O desenvolvimento de modelos experimentais para pesquisa tem importância fundamental na compreensão de fenômenos biológicos pois auxiliam o entendimento dos fenômenos naturais subjacentes aos diversos mecanismos fisiológicos e patológicos dos organismos vivos. Existem diversos modelos experimentais descritos podendo-se citar as culturas de células e tecidos (pesquisa *in vitro*), os animais de laboratório (pesquisa *in vivo*) e os estudos anatômicos, geralmente em cadáveres de seres humanos.(1).

Dentre os animais empregados para estudo *in vivo* tem-se aqueles heterogênicos (consanguíneos, heterocruzados, heterogâmicos, *outbred*) obtidos mediante cruzamentos ao acaso, sendo estes os animais que fazem parte da maioria das pesquisas laboratoriais, como os camundongos (*Mus musculus*, *Swiss Webster*), ratos (*Rattus norvegicus* - Wistar) e hamsters (*Mesocricetus auratus*) (2). O fato dos animais isogênicos (consanguíneos, endocruzados, isogâmicos, *inbred*) apresentarem um índice de 99% de homozigose entre os genes alelos(3) permite a criação de populações estáveis e geneticamente homogêneas, característica essa que favorece a redução no número de animais em pesquisa. Tem-se ainda animais transgênicos construídos a partir da Engenharia Genética (4) os animais mutantes decorrentes a mutações espontâneas ou produzidas em laboratório, conhecidos como “mutantes provocados”(SANTOS, 2002).

O camundongo (*Mus Musculus*) de laboratório é um excelente modelo biológico, largamente utilizado para o estudo de inúmeras doenças humanas.

Devido as suas características, diversas linhagens isogênicas já foram desenvolvidas utilizando seu *background* genético, muitas das quais já possuem seu genoma sequenciado e mapas genéticos das variações do genoma disponibilizado em bancos de domínio público (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs (5) (ADAMS et al., 2015). Neste sentido, estudos que avaliaram a equivalência entre os genomas murino e humano demonstraram que aproximadamente 99% dos genes de camundongos possuem gene homólogo no genoma humano. Fato este que comprova que esta espécie é um modelo valioso, principalmente para o estudo translacionais que objetivam elucidar a fisiopatologia das doenças humanas(7)(8)(6)

Em relação as mutações, na atualidade já foram identificadas mais de quatro mil mutações espontâneas no genoma do camundongo, as quais foram induzidas por radiação ou agentes químicos. Estas mutações podem se manifestar em diversos fenótipos que podem estar relacionados a inúmeras alterações impactando diferentes órgãos e sistemas (International Mouse Strain Resource (IMSR): <http://www.findmice.org/>).

As tecnologias modernas de engenharia genética nos permitem manipular o genoma do camundongo de maneiras cada vez mais complexas para modelar a biologia e as doenças humanas. Como resultado, o número de linhagens de camundongos carregando transgenes ou mutações induzidas aumentou acentuadamente. A compreensão completa da nomenclatura da cepa e do gene é essencial para garantir que os pesquisadores saibam que tipo de camundongo eles têm e o que esperar em termos de fenótipo. Camundongos geneticamente modificados alteram a função do gene pela superexpressão, eliminação ou modificação de um produto do gene. O fenótipo resultante é muitas vezes inesperado e não completamente compreendido, necessitando de cuidados especiais e estratégias de criação e manejo potencialmente complexas. (<https://www.ufmg.br/proex/cpinfo/educacao/docs/02i.pdf>).

Os camundongos mutantes mais utilizados para a investigação de doenças humanas são descritos na tabela abaixo (Tabela 1).

Um dos agentes químicos mais utilizados para induzir mutações em camundongos é o N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), fórmula química $C_3H_7N_3O_2$. O ENU

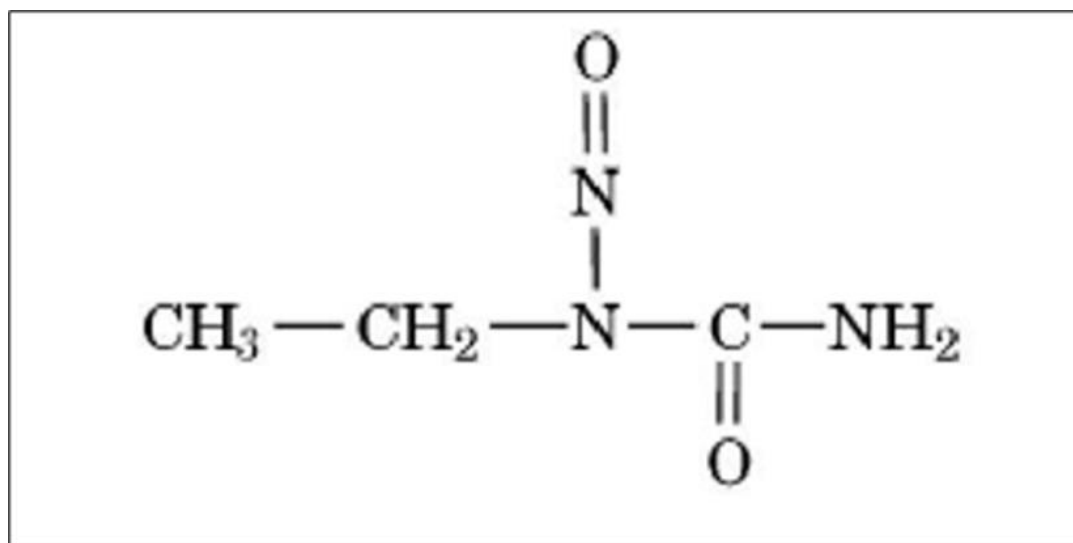
é um composto que causa mutações pontuais ao acaso por troca de uma única base nitrogenada pela alquilação direta dos ácidos nucléicos. Como parte de seu mecanismo mutagênico, o grupo ethyl do ENU pode ser transferido para radicais de oxigênio ou de nitrogênio em vários sítios reativos da molécula de DNA. O grupo ethyl sozinho não constitui uma mutação, porém sua presença pode causar erro na identidade da base etilada durante a replicação do DNA e resultar em erro no pareamento das bases nitrogenadas, e dessa maneira, ocorrerem as mutações pontuais (9). No entanto, eventualmente também pode ser observado a ocorrência de pequenas deleções decorrentes a sua presença na molécula do DNA (10) (11).

Tabela 1. Camundongos mutantes mais utilizados para investigação de doenças humanas(14).

Mutante	Herança	Cromossomo	Doenças
BEIGE (LYST BG)	Recessivo	cromossomo 13.	Síndrome de Chediak-Higashi
NUDE (HFH11 NU)	Recessivo	cromossomo 11	Estudo do timo nas respostas imune.
LAMA 2 DY	Recessivo	cromossomo 10.	Distrofia muscular
HAIRLESS (HR)	Recessivo	cromossomo 14.	Baixa resposta imunológica por deficiência de células <i>T helper</i> .
LEPR DB	Recessivo	cromossomo 4.	Diabetes
LEP OB	Recessivo	cromossomo 6	Obesidade
SCID (PRKDC SCID)	Recessivo	cromossomo 16	Estudo do sistema imune e nas transplantações, metástases de tumores humanos.

Um dos agentes químicos mais utilizados para induzir mutações em camundongos é o N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). O ENU é um composto que causa mutações pontuais ao acaso por troca de uma única base nitrogenada pela alquilação direta dos ácidos nucléicos. Como parte de seu mecanismo mutagênico, o grupo ethyl do ENU pode ser transferido para radicais de oxigênio ou de nitrogênio em vários sítios reativos da molécula de DNA. O grupo ethyl sozinho não constitui uma mutação, porém sua presença pode causar erro na identidade da base etilada durante a replicação do DNA e resultar em erro no pareamento das bases nitrogenadas, e dessa maneira, ocorrerem as mutações pontuais (9). No entanto, eventualmente também pode ser observado a ocorrência de pequenas deleções decorrentes a sua presença na molécula do DNA (10) (11).

Fig.1 Fórmula química do N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)



A mutagênese induzida em camundongos, pelo ENU, é realizada pela injeção em camundongos machos por via intraperitoneal que irá induzir mutações nas espermatogônias. Este tratamento inicialmente leva os animais a uma esterilidade momentânea. Num segundo momento, as espermatogônias mutadas

repovoam os testículos que começam a produzir clones de espermatozoides mutados, sendo as mutações de transversões AT para TA ou as transições AT para GC as mais comumente observadas, sendo a taxa de mutação diretamente dependente da dose administrada de ENU administrada e da linhagem de camundongo utilizada (12).

Massironi et al. (13) induziram uma série de mutações em camundongos utilizando o agente mutagênico químico ENU. Os pesquisadores identificaram 11 novos alelos mutantes, dos quais três mutações eram novos alelos no locus onde pelo menos outro alelo mutante já havia sido descrito. Dentre oito mutações, cinco delas pareciam ser originais e ocorreram em loci no qual nenhum alelo mutante já havia sido descrito anteriormente. A primeira mutação mapeada foi o mergulhador identificada no gene Otopetrin 1 (Otop1mlh/mlh), localizada no cromossomo 5. Os camundongos homozigotos apresentavam disfunção vestibular caracterizada fenotipicamente pela incapacidade de nadar, posição inclinada da cabeça (head tilt), movimentos de agitação quando suspensos pela cauda e defeitos na morfogênese das otocônias (14). Outros demais mutantes obtidos nesse projeto (careca, equilíbrio, fraqueza, rodador, sacudidor de cabeça e sem pelo) já foram mapeados e sua caracterização fenotípica está sendo objeto de estudo por diversos autores(15)(16)(17) (18). A tabela 1 abaixo, retirada do trabalho de Massironi et al (13) mostra algumas das doses utilizadas do ENU para indução de diferentes mutações. A Tabela 2 mostra os mutantes desenvolvidos pelo ENU segundo Massironi e colaboradores (19).

Tabela 2. Mutações induzidas por ENU, seu fenótipo, e símbolos

Mutação	Símbolo	Tipo de herança	Cromossomo mapeado	Candidato(s)	Fenótipo
<i>Anêmico</i>	<i>Anem</i>	Dominante	Cr. 7	Hbb	anemia
<i>bate-palmas</i>	<i>bapa</i>	recessivo	Cr. 15	Kmt2d	Bater patas traseiras
<i>careca</i>	<i>carc</i>	recessivo	Cr. 7	Cyp2b9, Vwa3a, Cars, Lgals, Sipa	Falhas na pelagem
<i>cruza-pernas</i>	<i>crup</i>	recessivo	Cr. 11	Slfn1, Slfn9, Taf15, Heatr6, Car4, Apoh	Cruzar trem traseiro
<i>equilíbrio</i>	<i>eqlb</i>	recessivo	Chr. 17	Nox3	Inclina a cabeça
<i>fraqueza</i>	<i>fraz</i>	recessivo	Chr. 1	Dst, Cntnap5a, Kihl12	Perda progressiva da coordenação motora
<i>mergulhador</i>	<i>mlh</i>	recessivo	Cr. 5	Otop1	Inclina a cabeça
<i>nervoso*</i>	<i>nerv</i>	recessivo	-	-	Crises audiogênicas
<i>rodador</i>	<i>roda</i>	recessivo	Cr. 10	Pcdh	Roda em círculos
<i>Sacudidor</i>	<i>Sacc</i>	Dominante	Chr. 15	Celsr1, Tubgcp6	Sacode a cabeça
<i>sem pelo</i>	<i>nude</i>	recessivo	Cr. 11	Foxn1	Sem pelos

* mutação perdida

1.20 camundongo *bapa*

Dentre os camundongos mutantes desenvolvidos pelo grupo liderado pela Dra. Sílvia Maria Gomes Massironi, do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) destaca-se o camundongo mutante recessivo denominado de *bate-palmas* (*bapa*), foco de estudos deste trabalho.

As mutações foram induzidas utilizando o agente químico ENU durante a execução de um projeto colaborativo entre o Biotério do Departamento de Imunologia do ICB/USP, o Departamento de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e o Instituto Pasteur de Paris da França (19). A denominação *bate-palmas* (*bapa*) veio da observação de quando o camundongo *bapa* era suspenso pela cauda, ele batia as patas traseiras como mostra a figura abaixo.

Fig.2. Visão do camundongo *bate-palmas*(*bapa*)

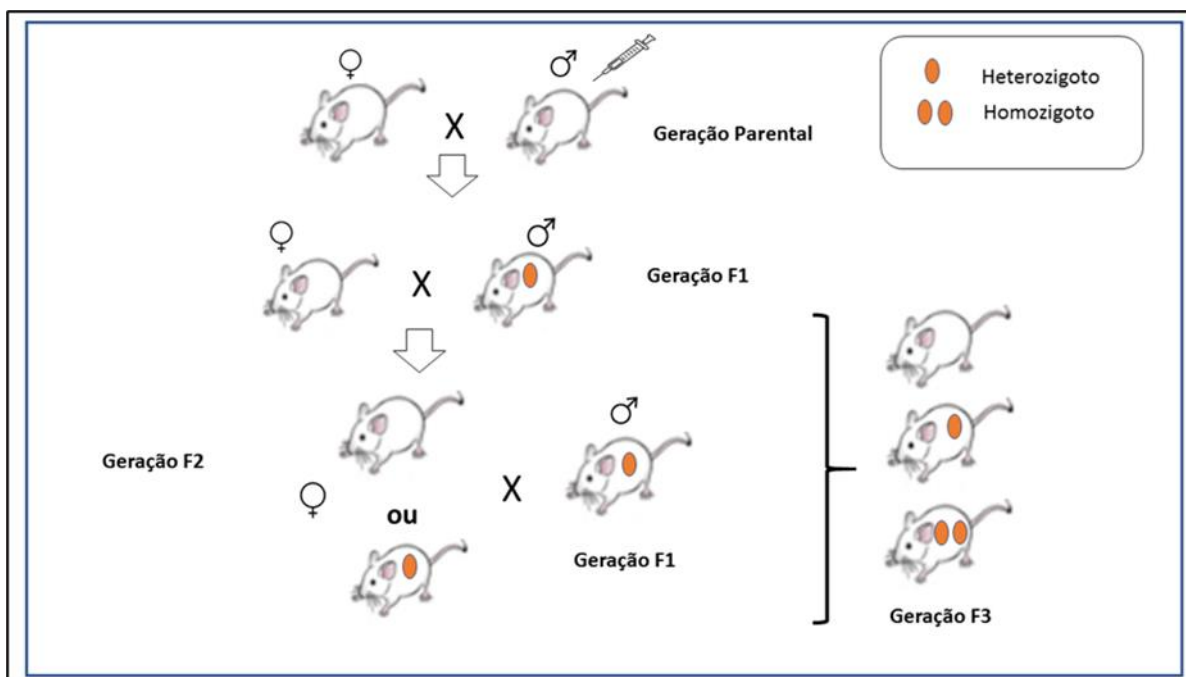


Retirado de: Yamamoto et al. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP. v. 16 n. 1 (2018).

Resumidamente, esta mutação foi obtida após o tratamento de camundongos BALB/c machos com o doses múltiplas (1 doses semanal durante 4 semanas) do agente mutagênico ENU (100mg/kg, por via intraperitoneal). O período de esterilidade destes camundongos foi aproximadamente de 20 semanas, e após esse intervalo, esses machos foram acasalados com fêmeas BALB/c não tratadas.

A geração G1 desse cruzamento foi observada para mutações dominantes. Para recuperar as mutações recessivas foram feitos cruzamentos em três gerações. Os machos G1 que não portavam mutações dominantes foram então acasalados com fêmeas isogênicas BALB/c e, finalmente, acasalados com suas filhas (G2). Após esses cruzamentos, a maior parte das mutações recessivas encontrava-se em homozigose podendo ser observadas na geração G3(19). A fig. Ilustra o protocolo mutagênico por meio do uso do ENU.

Fig.3 Protocolo mutagênico por meio do uso do ENU.



Fonte: Orlando, 2019 (Dissertação de mestrado disponível em https://www.unip.br/cursos/pos_graduacao/strictosensu/patologia/dissertacoes_defendidas_2019.a_spx)

Estes camundongos foram observados quanto a formação do esqueleto, pelagem, olhos, orelhas, comportamentos patológicos, reações, crescimento, anemia, sinais de doenças neurológicas, mortalidade, entre outros. A característica mais evidente do mutante *bate palmas* foi um movimento anormal dos membros posteriores quando levantado pela cauda, simulando a ação de bater palmas, que

sugere deficiência na coordenação motora. Por meio de acasalamentos e pela observação da prole, o modo de herança da mutação foi identificado como sendo autossômico recessivo (19).

Inicialmente o mapeamento genético foi realizado por PCR utilizando-se um painel de 54 marcadores moleculares do tipo microssatélite, polimórficos entre as linhagens parentais, distribuídos pelo genoma do camundongo (abrangendo os 19 cromossomos autossômicos), conforme descrito por Yamamoto et al (YAMAMOTO et al., 2019). Esses resultados indicaram que o gene responsável pela mutação estava localizado no cromossomo 15 do camundongo. A técnica de sequenciamento do exoma identificou um único SNV (Single Nucleotide Variant) candidato no gene lysine (K)-specific methyltransferase 2D (*Kmt2d*), localizado no cromossomo 15 do camundongo, descrito na literatura como responsável pela síndrome de Kabuki em humanos (21)(22) o sequenciamento pelo método de Sanger demonstrou uma troca T/C no transcrito (c.A3865G:p.T1289A) localizada no exon 13. Os resultados do sequenciamento sugeriram uma forte evidência da presença do alelo em homozigose na população mutante (comunicação pessoal).

Em humanos, a perda da funcionalidade do gene *KMT2D* do cromossomo 12 é tida como responsável pela Síndrome de Kabuki, uma síndrome rara de anomalia congênita autossomal dominante que pode se apresentar de leve a grave grau de deficiência intelectual, retardo de crescimento e uma variedade de que envolvem o desenvolvimento e a função de diversos órgão e sistemas(22) Esta síndrome é uma condição rara, mas reconhecível. As principais características clínicas incluem atraso no desenvolvimento, crescimento, anormalidades esqueléticas, várias malformações de órgãos, e uma *gestalt* facial distinta que lembra a maquiagem dos atores no tradicional Kabuk japonês(23). Quanto aos principais sinais externos observa-se. fenda palatina e fenda labial, sobrelhas arqueadas, cílios e pálpebras alongados, ponta do nariz baixa além de perda auditiva e braquidactilia(CACIOLO et al., 2018). Apresenta ainda orelhas proeminentes, luxação no quadril e patela, escoliose, dentição espaçada e incoordenação motora (25)(26,27) Pacientes com KABUKI apresentam redução na atenção,

hiperatividade/impulsividade, comportamentos obsessivo e ansiedade além deficiência intelectual (28)(29).

Esta síndrome, descrita pela primeira vez no Japão, foi assim designada por causa da semelhança das expressões faciais provocadas pela síndrome com a maquiagem usada no teatro tradicional japonês, o teatro Kabuki (30). Yamamoto e colaboradores (20) caracterizaram o fenótipo destes mutantes mostrando que eles apresentavam prejuízos sensoriais e psicomotores além de hipotonia, hiperatividade em campo aberto bem como redução no reflexo auricular.

Na figura abaixo estão ilustradas as principais características de pacientes com a Síndrome de Kabuki.

Fig.4. Principais características de pacientes com a Síndrome de Kabuki.



Retirado de : <https://edif.blogs.sapo.pt/2020/09/>

1.3 KMT2D e modificações de cromatina

As modificações da cromatina relacionadas a regulação epigenética envolvem modificações pós-traducionais covalentes (PTMs) das partes salientes, região das caudas de histonas amino-terminais, pela adição de um grupamento acetil ou metil. As modificações de metil podem ser mono-, di- ou trimetilação, quando ocorre na cauda da lisina. Essas modificações fazem parte do controle fino

da expressão gênica por promover alterações na estrutura da cromatina, facilitando assim a atração ou repulsão dos fatores de transcrição (31).

A lista crescente de doenças humanas causadas por mutações em genes que codificam proteínas essenciais para o controle da remodelação destaca a importância da estrutura da cromatina na saúde humana. Diferente das alterações epigenéticas, as mutações em genes codificadores das proteínas modificadoras ou remodeladoras de cromatina mutados podem alterar secundariamente os estados da cromatina, componentes críticos do epigenoma

Mutações em genes de PTMs, como a histona acetiltransferase e histona metiltransferase, como também dos modificadores de citosinas de DNA, como as DNA metiltransferases, podem causar fenótipos multissistêmicos complexos devido aos efeitos a jusante da desregulação da expressão de um grande número de seus genes alvos(32). Dentre a classe das histonas metiltransferases, a proteína *Mixed Lineage Leukemia 2* (MLL2), também conhecida como KMT2D, pertence à família das histonas H3 lisina 4 (H3K4) metiltransferases de mamíferos. É uma proteína de 2715 aminoácidos, amplamente expressa em tecidos humanos adultos e um parálogo da proteína MLL1. Seu domínio SET C-terminal é responsável pela formação do complexo WRAD com os ortólogos das proteínas de mamífero WDR5 (repetição WD domínio 5, homólogo de Swd3), RbBP5 (proteína de ligação a retinoblastoma 5, homólogo de Swd1), ASH2L (ausente, pequeno ou homeótico-2 like, homólogo de Bre2) e DPY30 (homólogo de Sdc1). O módulo WRAD regula a forma enzimática ativa do complexo, confere estabilidade e permite o recrutamento para a cromatina(33). Este complexo promove a trimetilação de H3K4 (H3K4me3) em promotores de genes específicos e sítios reguladores cis próximos, regulando assim a transcrição gênica. Além disso, KMT2D desempenha um papel crítico no desenvolvimento e certas deleções da linha germinativa de KMT2D têm sido associadas a retardo de crescimento precoce, defeitos do tubo neural, apoptose e morte embrionária(34).

A trimetilação de H3K4 é associada à ativação transcricional em uma variedade de espécies eucarióticas por estar associada às regiões 5' de praticamente todos os genes ativos e se correlacionar fortemente com a ocupação

enzima polimerase II ativa e de eventos de acetilação de histonas (33), estudos tem demonstrado que distúrbios de mutações em fatores modificadores de cromatina, como gene *KMT2D* podem impactar significativamente no controle transcricional e apresentar características clínicas sobrepostas indicando que podem ter funções coreguladoras durante o desenvolvimento (35),(36)(37).

Mutações no gene da Histona-lisina N-metiltransferase 2D (*KMT2D*) foram identificadas como a principal causa de Síndrome Kabuki. Em mamíferos sua atividade é proeminente de mono-metiltransferase de marca H3K4 em regiões enriquecidas e pode apresentar certa redundância funcional parcial com a histona metiltransferases *KMT2C* (38). Estudos adicionais identificaram mutações em até 74% dos pacientes *KABUK1* (39). Ainda foi demonstrado que pacientes com o fenótipo Kabuki, mas sem nenhuma mutação em *MLL2*, apresentavam mutações no gene que codifica a histona demetilase *KDM6A* (muitas vezes referidas como *UTX*). Este gene que codifica a proteína demetilase 6A/*UTX* específica de lisina que interage com *MLL2*, reconhecidos como *KABUK2*.(31).

Devido à similaridade genética e comportamentais foi proposto que o mutante *Bapa* poderia ser um modelo de Kabuki. Além disto, desde que na desordem de Kabuki foi relatado aumento da susceptibilidade a infecções e na Kirsten e colaboradores, evidenciaram alterações na emissão de vocalizações ultrassônicas e aumento nas respostas comportamentais, imuno-histoquímicas e neuroquímicas após administração da endotoxina lipopolissacarídeo(40), sugerindo também que o camundongo *Bapa* seria um modelo da desordem de Kabuki.

1.4 Sobre o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), um distúrbio comportamental que afeta crianças e adultos, foi denominado de várias maneiras ao longo da sua história (40). Seu primeiro relato foi transtorno de déficit de atenção e hiperatividade foi feito no XIX, e em meados da década de 40 surgiu a nomenclatura “lesão cerebral mínima”, que mais tarde foi modificado para “disfunção cerebral mínima”, relacionando as alterações características da síndrome às disfunções nas vias nervosas(41). Atualmente segundo o sistema de

classificação usado em psiquiatria o CID- 10 (código internacional de doenças (transtornos hiperanéticos) classifica o TDHA como F90.0 e o DSM -IV Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais como DSM-5 (2013) (transtorno por déficit de atenção com hiperatividade, tipo desatento, hiperativo, impulsivo e combinado, apresentando mais semelhanças do que diferenças no diagnósticas da síndrome(42)

Em uma revisão sistemática sobre a prevalência de TDHA levando em conta 588 estudos com 3.277.590 participantes mostrou que a prevalência global de TDAH em crianças e adolescentes foi de 8,0% (IC95% 6,0-10%). A estimativa da prevalência foi duas vezes maior nos meninos (10%) comparada com as meninas (5%). Dos três subtipos de TDAH, descobriu-se que o tipo de TDAH desatento é o tipo mais comum de TDAH, seguido pelo tipo hiperativo e pelos tipos combinados(43)..

Estudos apontam que o diagnóstico acontece geralmente por volta de 7 anos de idade, embora ele possa ser observado em idade mais precoce. É então na idade escolar, devido a observação de alterações comportamentais da criança como; dificuldade de atenção e hiperatividade(44) , dificuldade de aprendizado e motor (equilíbrio e noção de espaço), que prejudicam a criança no desenvolvimento na vida escolar, que o diagnóstico é feito(45).

O TDAH deve ser considerado dentro do contexto do que é apropriado em termos de desenvolvimento e cultura para uma pessoa. É considerada uma disfunção do funcionamento executivo, predominantemente uma atividade do lobo frontal. Portanto, pacientes com TDAH apresentam deficiência não apenas na atenção e foco, mas também na tomada de decisões e na regulação emocional. Crianças com TDAH podem ter dificuldade com interações sociais, podem ficar facilmente frustradas e podem ser impulsivas. Eles são frequentemente rotulados como “criadores de problemas”.

Assim, o TDAH é tido como uma condição psiquiátrica que afeta a capacidade funcional das crianças. Indivíduos que sofrem desse transtorno apresentam padrões inadequados de desatenção, hiperatividade ou impulsividade. Embora existam dois diagnósticos diferentes de Transtorno de Déficit de Atenção

versus Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade, o DSM IV classificou esse transtorno em três subtipos: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo ou tipo combinado(46).

O subtipo é determinado pela quantidade de manifestações clínicas observadas em cada modalidade. O subtipo predominantemente hiperativo-impulsivo (18% dos casos) é classificado quando há seis ou mais sintomas de hiperatividade-impulsividade com menos de seis sintomas de desatenção. O subtipo predominantemente desatento (27% dos casos) é diagnosticado quando apresenta seis ou mais sintomas de desatenção com menos de seis sintomas de hiperatividade-impulsividade. O subtipo combinado (55% dos casos) é classificado quando seis ou mais sintomas de desatenção somados a seis ou mais sintomas de hiperatividade-impulsividade(47) (48).

Segundo Desidério et al.(49) é importante diferenciar o TDAH de outros transtornos clínicos, pois podem ocorrer sintomas que se sobrepõem a eles. Os transtornos do humor, como depressão e ansiedade, podem ser mal diagnosticados em um paciente com TDAH, pois esses sintomas (desatenção e falta de foco, perda de memória, distração etc.) geralmente persistem em indivíduos adultos com o transtorno. Os transtornos por abuso de substâncias também devem ser cuidadosamente examinados, pois crianças com TDAH são propensas ao abuso destas substâncias (50). É importante descartar a presença de distúrbios auditivos, aprendizagem e do desenvolvimento em indivíduos no diagnóstico do TDHA(51).

Para propor um modelo animal de TDHA implica que as anormalidades comportamentais sejam análogas às aquelas expressas por pacientes com TDAH. Desta forma, para a validação do modelo as características diagnósticas do TDAH desatenção, impulsividade e hiperatividade são fundamentais para a validação de qualquer modelo animal deste transtorno. Várias intervenções experimentais, como lesão neurotóxica de ratos neonatos com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), alterações genéticas ou endogamia seletiva de roedores produziram animais, até certo ponto, que expressam cada uma dessas deficiências(52,53)

Segundo Kessi et al (43) foram descritos vários genes se associam ao TDAH: DRD1, DRD2, DRD4, DAT1, TPH2, HTR1A, HTR1B, SLC6A4, HTR2A, DBH, NET1, ADRA2A, ADRA2C, CHRNA4, CHRNA7, GAD1, GRM1, GRM5, GRM7, GRM8, TARBP1, ADGRL3, FGF1, MAOA, BDNF, SNAP25, STX1A, ATXN7 e SORCS2. (54) Alguns desses genes ocorrem tanto em seres humanos quanto em modelos animais, enquanto outros somente em humanos ou em modelos animais. A respeito de modelos animais, nota-se que a maioria deles são nocautes e não geram alteração genética similar a dos pacientes(55). Além disso, alguns dos polimorfismos genéticos relatados diferem de acordo com os grupos étnicos . A maioria dos modelos animais disponíveis está relacionada à via dopaminérgica. Alterações epigenéticas, incluindo SUMOilação, metilação e acetilação, foram relatadas em genes relacionados à via dopaminérgica. A via dopaminérgica continua a ser crucial na patogênese do TDAH, podendo ser afetada por fatores ambientais e outras vias(56,57). No entanto, ainda não está claro como os fatores ambientais se relacionam com todas as vias dos neurotransmissores, havendo necessidade de mais estudos para compreender estas relações(57). Embora vários genes tenham sido relacionados ao TDAH, existem poucos estudos em modelos animais sobre a maioria dos genes, e eles não geram a alteração genética dos pacientes. Mais modelos animais e estudos epigenéticos são necessários.

Em pacientes com TDHA o transportador de dopamina (DAT-1) está hiperativo, portanto se há mais transportadores de dopamina trabalhando, removendo a dopamina mais rápido do cérebro de pessoas com TDAH, pode ocorrer insuficiência de dopamina para exercer o seu efeito completo. O metilfenidato é o medicamento mais comumente utilizado para TDAH (58), embora seu mecanismo de ação não esteja totalmente conhecido. Neste sentido, algumas evidência indicam que ele iniba a proteína responsável pelo transporte de dopamina no espaço sináptico, a DAT-1, modulando assim a transmissão de neurotransmissores catecolaminérgicos nas vias fronto-estriatal e fronto-parietal(59). Estudos de neuroimagem em indivíduos saudáveis e em pacientes com TDAH indicam que doses agudas de metilfenidato regulam positivamente e mesmo normalizam regiões cerebrais que estão pouco ativas no TDAH(60).

Neste sentido, mais de 100 ensaios clínicos já verificam que o metilfenidato é uma das intervenções mais bem-sucedidas para o tratamento do TDAH, reduzindo os sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade (Stein et al., 2003), bem como melhorando as funções executivas(61). No entanto, cerca de 30 por cento dos indivíduos não respondem bem ao metilfenidato não apresentando efeitos benéficos a longo prazo e promovem efeitos colaterais em especial na adolescência (62). Acrescente-se ainda que intervenções não farmacológicas, como psicoterapia cognitivo-comportamental(63), treinamento cognitivo(64), treinamento de pais para crianças pré-escolares (65)ou intervenções dietéticas(66) apresentam eficácia clínica pequena a moderada(45).Um dos problemas do emprego dos estimulantes centrais no tratamento do TDHA são seu efeitos colaterais bem como seu uso abusivo(67)

Mais recentemente, Anas Sohail et. al (68)revisando os efeitos da cafeína e a L-teanina, compostos naturais encontrados principalmente no chá e no café, respectivamente, mostraram que a combinação dos dois compostos melhorou a atenção e a cognição geral entre meninos com TDAH, enquanto reduziu o estresse agudo leve e no trabalho, em homens e mulheres com TDHA de 50 a 69 anos no Japão. Depois de revisar os estudos, os autores apontaram que a combinação dos dois produtos tem resultados clínicos favoráveis nos domínios da atenção, memória, cognição e hiperatividade.

Também Vázquez et al. (69) revisando os efeitos pré-clínicos da exposição a cafeína e de outros antagonistas de receptores da adenosina 2 (A2AR) sugeriu que eles podem ser usados para o tratamento de problemas motivacionais da depressão e dos sintomas do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade. Outros autores também relacionam os receptores da adenosina e seus antagonistas como efetivos em melhorar o comportamento de indivíduos com TDHA(70,71) .

Estes resultados apontam para a participação dos receptores da adenosina no TDHA(72), que serão enfocados neste trabalho.

1.5 Modelos animais de TDHA

Para propor um modelo animal de TDHA implica que as anormalidades comportamentais sejam análogas às aquelas expressas por pacientes com TDAH. Desta forma, para a validação do modelo as características diagnósticas do TDAH desatenção, impulsividade e hiperatividade são fundamentais para a validação de qualquer modelo animal deste transtorno.

Várias intervenções experimentais, como lesão neurotóxica de ratos neonatos com 6-hidroxidopamina (6-OHDA)(73), alterações genéticas ou endogamia seletiva de roedores produziram animais(74), até certo ponto, que expressam cada uma dessas deficiências.

Dentre os modelos de TDHA, o rato SRD- espontaneamente hipertensivo-, é o mais estudado tendo sido desenvolvido por endogamia de ratos da linhagem Wistar-Kyoto (WKY). Este modelo animal mostra vários dos principais sintomas semelhantes aos da TDHA, como impulsividade, hiperatividade, déficit de atenção em comparação com rato WKY(75). Além das alterações comportamentais, o rato SHR exibe redução de dopamina no córtex pré-frontal, núcleo accumbens e corpo estriado. Não apenas o sistema dopaminérgico está alterado nestes animais mas também o da noradrenalina e do glutamato. Nestes animais a hiperatividade reduziu após o tratamento com metilfenidato e D-anfetamina sendo este efeito devido a interferência com a DAT(76,77).

Outro modelo é o camundongo nocaute para o gene do transportador de dopamina, o camundongo KO. Nesses animais os níveis de dopamina extracelulares são muito altos (cerca de 10 vezes em relação ao grupo selvagem) tanto no núcleo accumbens como no estriado(78).

Tem-se ainda o camundongo mutante Coloboma que foi desenvolvido por irradiação de nêutrons. Embora este camundongo apresente hiperatividade ele não é responsivo ao metilfenidato(79).

2. OBJETIVO GERAL

Estudos prévios de nosso grupo mostraram que o camundongo macho *bapa* apresentam comportamentos motores/exploratórios aumentados durante o período pré-puberal devido ao aumento da expressão da tirosina hidroxilase do estriado, sugerindo hiperatividade do sistema dopaminérgico do estriado. Além disto, observou-se aumento na atividade exploratória em campo aberto bem como da estereotipia induzida pela apomorfina a qual foi atribuída ao aumento da expressão gênica do receptor dopaminérgico DR1. Desta forma, neste trabalho procurou-se avaliar em modelos de hiperatividade, déficit de atenção e impulsividade camundongos machos e fêmeas *bapa*. Desde que a literatura aponta um papel da adenosina no TDHA, foram avaliadas as expressões dos receptores ADORA 1 e ADORA 2 estriatais nos camundongos *bapa* machos e fêmeas.

2.1. Objetivos específicos

Avaliar os camundongos mutantes *bapa* e *balb-c* quanto a:

- Hiperatividade.
- Comportamento compulsivo
- Atenção espacial
- Atenção baseada em objetos.
- Impulsividade.
- Expressão dos receptores de adenosina no estriado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Ética

Antes de qualquer procedimento, este projeto foi aprovado pela CEUA-UNIP CEUA nº6698260722 (ID 011373). Foram feitos todos os esforços, a fim de minimizar o sofrimento dos animais.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos 25 camundongos *bapa* (13 fêmeas e 12 machos) e 24 camundongos BALB/c (12 machos e 12 fêmeas) com 3 meses de idade ao início dos experimentos oriundos do Biotério central do Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil. Estes animais foram trazidos ao Biotério de Experimentação da Universidade Paulista e alojados em gaiolas de polipropileno (30 cm x 20 cm x 13 cm) máximo 5 camundongos/gaiola) com sistema de microisoladores (Tecniplast, Buguggiate, Italy), em temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (55 – 65%) com iluminação artificial (12-hr luz/12-hr escuro ciclo, luz às 7:00 da manhã). Os animais tiveram acesso à vontade à ração irradiada para roedores (Bio Base, Águas Frias, Brasil) e beberam água estéril (autoclavada). Além disso, maravalha esterilizada e livre de resíduos foi usada como cama para os animais. Após 10 dias de habituação, os experimentos foram iniciados.

3.3. Delineamento experimental

Com diferença de uma semana, os seguintes testes foram realizados em camundongos mutantes e BALB/c machos e fêmeas, de acordo com o nível de estresse do teste, tendo início com o procedimento de menor estresse até o de maior estresse: 1) Atividade geral em campo aberto; 2) Comportamento de autolimpeza; 3) Teste do labirinto em Y; 4) Teste de atenção baseado em objetos; 5) Teste de esquiva da altura. Após estes testes, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para coleta do encéfalo e o estriado isolado, para

avaliação da expressão dos receptores ADORA 1 e ADORA 2. A Fig.5 ilustra este delineamento experimental.

Fig.5. Delineamento experimental



Fonte: a própria autora

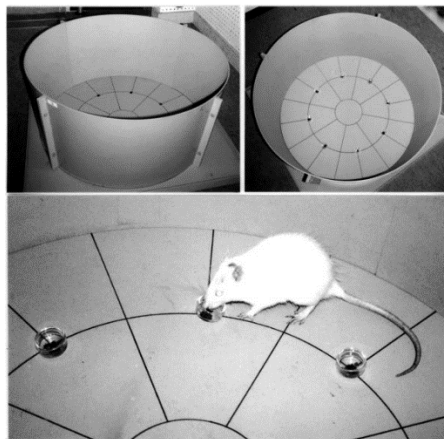
3.4.Procedimentos

3.4.1.Atividade geral em campo aberto

O objetivo deste teste foi avaliar se o camundongo bapa apresentava hiperatividade e a ocorrência de habituação dos animais ao campo aberto. O campo aberto utilizado possui 60 centímetros de diâmetro e 40 cm de altura, pintado de preto tendo sua arena dividida em 25 áreas (Fig.5). Os animais foram colocados no centro da arena ao início de cada sessão de teste e observados por 5 minutos. O teste foi repetido por mais 3 dias consecutivos. Os experimentos foram gravados para análise posterior. Os parâmetros observados foram: frequências de locomoção (uma unidade corresponde a penetração com as 4 patas em uma área do campo aberto), frequência de levantar-se (número de vezes que o animal ficou apoiado apenas nas patas traseiras, apoiando-se ou não nas paredes do campo aberto), tempo de limpeza (tempo em segundos que o animal se limpa), tempo de imobilidade (tempo em segundos que o animal não se move. Após cada sessão de

teste, as cı́balas e a urina foram removidas e a arena limpa com solução alcóolica a 5%.

Fig. 6 – Arena de campo aberto utilizada para avaliar a hiperatividade dos camundongos.



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/A-behaving-rat-in-an-open-field-apparatus-The-height-of-the-apparatus-is-45-cm-with-a_fig1_12109456

3.4.2. Comportamento de autolimpeza

O objetivo deste teste foi verificar se o camundongo *Bapa* apresentava comportamento repetitivo denominado na literatura como tipo-obsessivo(80). O comportamento de autolimpeza foi filmado por 30 minutos em uma pequena caixa de plástico transparente (20 x 20 x 25 cm) com um espelho na porção traseira da caixa que permitia visualizar se o animal apresentasse o comportamento de costas. As caixas de teste foram limpas com água/etanol a 5% após o término da gravação. Para a análise da atividade de limpeza, os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo em segundos gasto com a limpeza e frequência de limpeza. Foram computadas as limpezas de face, corpo de genitais. Uma nova sequência de limpeza começava quando o último comportamento de limpeza terminava por mais de 6 s (81) . A figura ilustra a caixa utilizada para observação do comportamento de autolimpeza dos camundongos.

Fig. 7. Caixa de observação de vidro para observação do comportamento de autolimpeza.

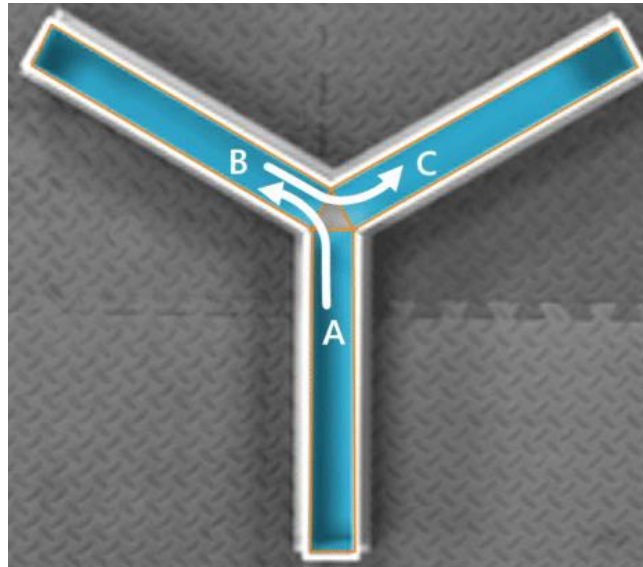


Fonte: A própria autora.

3.4.3. Teste do labirinto em Y.

O déficit de atenção foi avaliado usando o teste do labirinto em Y (82). Cada camundongo foi colocado em um dos braços do labirinto em Y (45 x 10 x 20 cm) e foi permitido explorá-lo livremente por 10 min. Os parâmetros avaliados foram: 1) entrada em um braço (entrada de todas as quatro patas em um braço; 2) comportamento de alternância real (uma entrada consecutiva em três braços sem repetições de braço). A alternância espontânea foi calculada como a o número de alternâncias reais. Todo procedimento foi filmado para análise posterior.

Fig.8. Labirinto em Y para avaliação da alternância espontânea.



Retirado de: <https://www.any-maze.com/features/setting-up-apparatus/>

3.4.4. Teste de atenção baseado em objetos (OBAT).

Este teste visou avaliar a atenção do animal, teste já validado previamente utilizando um modelo de TDAH (83). Cada camundongo foi habituado em duas caixas vazias (marcadas como câmara de exploração [EC] e câmara de teste [TC]) por 10 min/dia por dois dias consecutivos. Os camundongos também foram manuseados por 5 minutos após cada sessão de habituação. Um camundongo foi colocado no EC contendo cinco objetos do mesmo tamanho, mas de formas diferentes durante a sessão aquisição. Os cinco objetos deverão ter as seguintes formas: círculo, quadrado, cilíndrico, pentágono e em forma de estrela. Em seguida, o camundongo foi colocado no TC contendo um objeto familiar (círculo) e um novo (triângulo) e foi permitido mais 10 minutos de exploração do objeto. Os procedimentos serão filmados para análise posterior. Os experimentos foram filmados para análise posterior.

Fig.9. Teste de atenção baseado em objetos (OBAT).



Fonte: a própria autora.

3.4.5. Teste de esquia da altura

O teste de esquia da altura modificado foi utilizado para avaliar a impulsividade em camundongos(84). Neste teste foi utilizado um béquer de vidro invertido com 11 cm de diâmetro e 15 cm de altura. Cada camundongo foi colocado no centro da parte superior do béquer e atribuiu-se escores a seu comportamento como se segue: 0- o camundongo permanecia no centro do béquer; 1) o camundongo permanecia na periferia do béquer sem olhar para baixo; 2) o camundongo permanecia na periferia do béquer olhando para baixo mas com menos da metade do corpo inclinado para baixo; 4) o camundongo permanecia na periferia do béquer mas com mais da metade do corpo inclinado para baixo. Ao final de 7 minutos os escores foram somados de cada animal. Os procedimentos foram filmados para análise posterior.

Fig.10. Teste de esquiva da altura



Fonte: a própria autora.

3.4.6. Estudos moleculares

3.4.6.1. Extração de Ácido Ribonucleico (RNA) total – O RNA total foi isolado após homogeneização das estruturas em 0,5 mL do reagente TRIzol® a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), seguido pela centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos novos devidamente identificados, sendo desprezada a fase precipitada. Como etapa seguinte, a precipitação do RNA foi realizada pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). Após incubação a temperatura ambiente por 10 minutos as amostras foram novamente centrifugadas (14.000 rpm por 15 minutos). Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75%. Após a ressuspensão do RNA em 20 µL de água DEPC, a quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience) e armazenados a -80°C.

3.4.6.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) – O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da transcrição reversa de 2000 ng de RNA total previamente extraído e armazenado em Biofreezer (-80) na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo

com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 μL contendo 500 μM de dNTP, 25 $\mu\text{g/mL}$ de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 μM de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida a reação de síntese aconteceu durante 50 minutos a 50°C com posterior inativação enzimática a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído a concentração final de 100 ng/ μL e armazenado a -20°C.

3.4.6.3. Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (q-PCR) - Para o estudo do padrão de expressão gênica dos genes codificadores dos receptores de adenosina, *Adora1* e *Adora2* as reações foram realizadas com iniciadores específicos (**Tabela 1**) e tiveram como controle endógeno os genes *Gapdh* e β -actina. Todas as reações tiveram volume final de 10 μL ; contendo 5 μL de SYBR Green I Master, 0,4 μM de iniciadores específicos, 1 μL do cDNA sintetizado e q.s.p. de água *Milli-Q Rnase free*. A quantidade relativa dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo foi subtraída pela média do Ct dos controles utilizados, resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão substituímos o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à média da expressão gênica dos genes utilizados como normalizadores. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em duplicata técnica e triplicata na forma absoluta para a comparação do perfil transcricional entre as diferentes estruturas cerebrais e normalizados em relação ao controle (atribuído valor 1) para avaliação do efeito da neuroinflamação.

Tabela 1. Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica.

Gene (ID)	Iniciador	5'- 3' Sequência	Condições de reação	Tamanho do produto (pb)
Adora1 (11539)	Forward	AGA ACC ACC TCC ACC CTT CT	95°C -15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	227
	Reverse	TAC TCT GGG TGG TGG TCA CA		
Adora2A (11540)	Forward	ATC CCT CAG AGA AGG GAA GC	95°C -15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	300
	Reverse	AGC TTC CCA AAG GCT TTC TC		
β -actina (11461)	Forward	TCT TGG GTA TGG AAT CCT GTC	95°C -15s; 58°C - 30s; 72°C - 30s	82
	Reverse	AGG TCT TTA CCG ATG TCA A ACG		
Gapdh (14433)	Forward	CCG CAG CGA GGA GTT TCT C	95°C -15s; 58°C - 30s; 72°C - 30s	530
	Reverse	GAG CTA AGC TCA GGC TGT TCC A		

3.5. Análise estatística

A homocedasticidade foi verificada usando o teste F ou o teste de Bartlet e a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os testes para duas variáveis foram analisados pelo teste *t* de Student ou U- de Mann-Whitney, na dependência da normalidade dos dados. Dados com mais de dois grupos foram analisados pela ANOVA de uma via e aqueles de dois fatores pela ANOVA de duas vias. Os dados do campo aberto foram analisados pela RM ANOVA de duas vias. Os resultados apresentados como médias e respectivos erros-padrão. Os resultados foram considerados como significantes quando $\alpha < 0.05$.

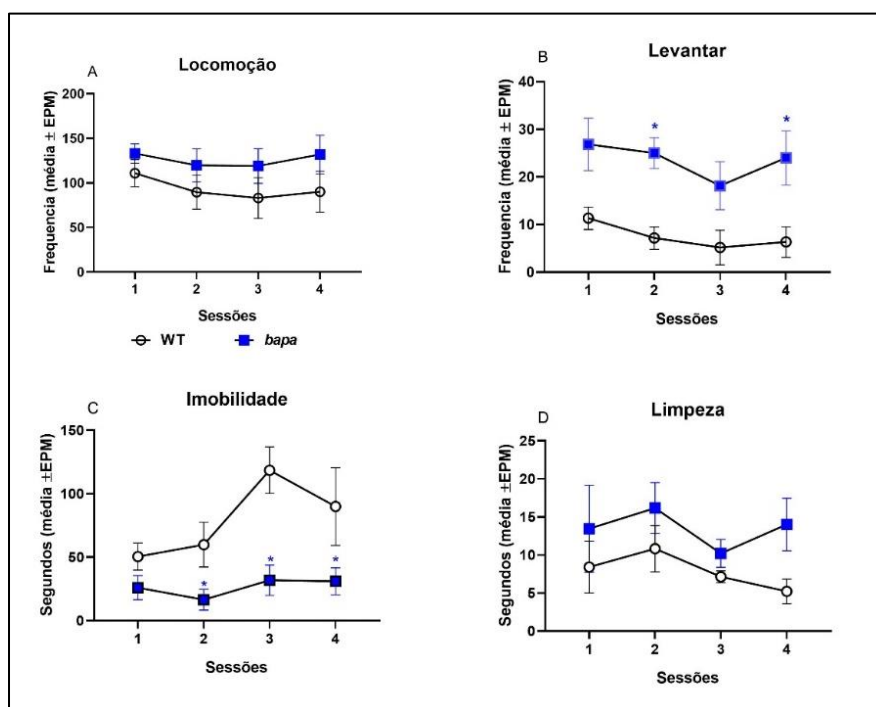
4. RESULTADOS

ESTUDOS EM CAMUNDONGOS MACHOS

4.1. Atividade geral em campo aberto

A fig.11 ilustra a atividade geral de camundongos bapa machos observados por 4 dias em sessões de 5 min. A RM ANOVA revelou aumento significativo das frequências de locomoção (Fig.A) e levantar (Fig.B) dos camundongos bapa machos em relação aos camundongos WT em todas as sessões. Inversamente a duração de imobilidade (Fig.C) foi menor nos camundongos bapa em relação àqueles WT. Não houve diferenças entre os grupos na duração de limpeza (Fig.D). Os dados da análise estatística estão na tabela suplementar 1.

Fig11. Atividade geral de camundongos machos WT ou bapa observadas no campo aberto por 4 dias consecutivos.

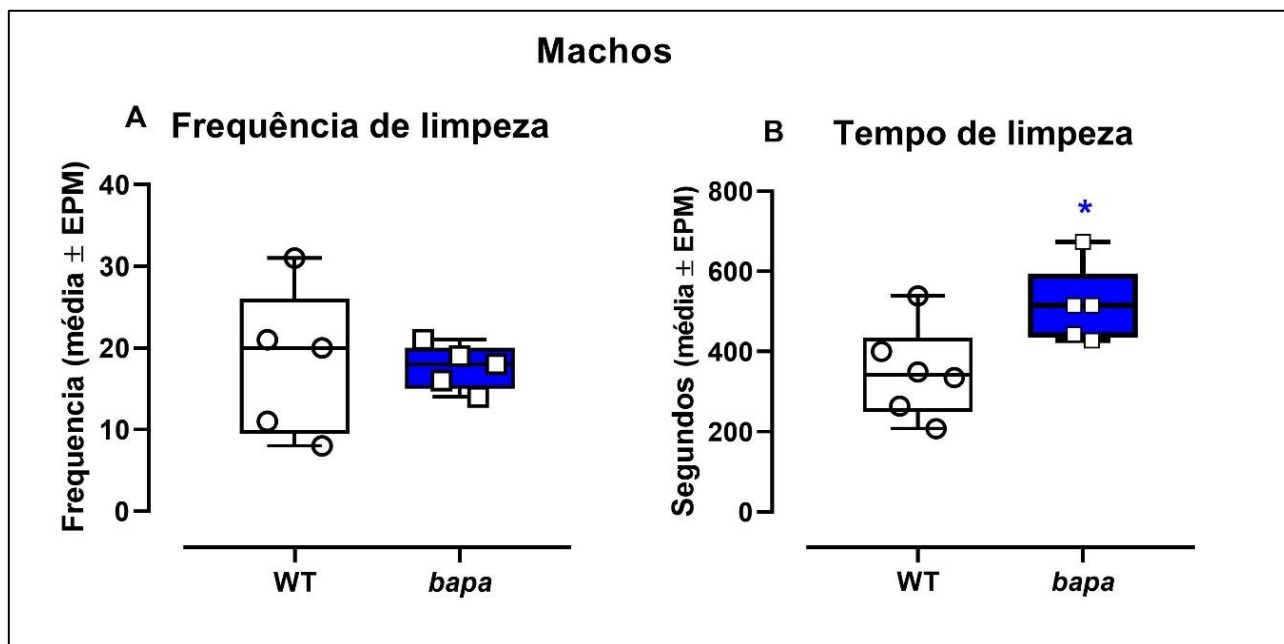


A- Frequência de locomoção; B- frequência de levantar; C- duração em segundos da imobilidade; D- duração em segundos de limpeza. N=6/grupo. RM ANOVA. * P < 0.05 em relação ao grupo controle.

4.2. Comportamento de autolimpeza

A fig.12. Ilustra os parâmetros da limpeza de camundongos machos dos grupos WT e bapa. Observa-se aumento na duração de Limpeza (Fig.B) porém sem alterações na sua frequência (Fig. A).

Fig12. Frequência e duração de limpeza de camundongos machos dos grupos WT e bapa.

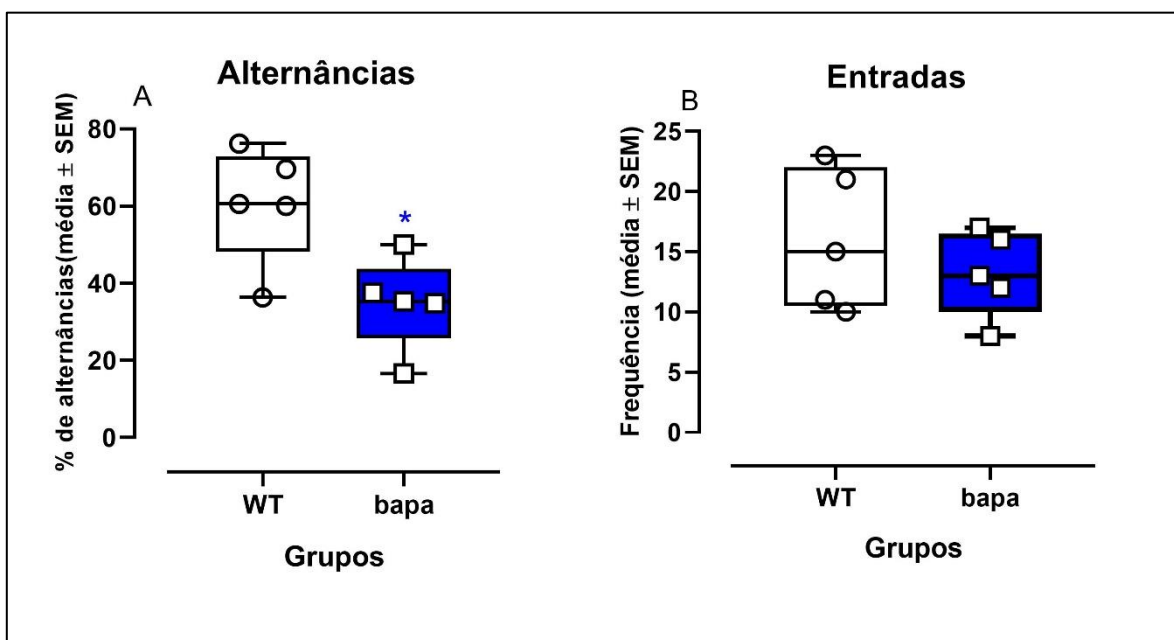


A-Frequência de limpeza de camundongos machos WT e bapa; B-Duração de limpeza em segundos de camundongos machos WT e bapa. N-5/ grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo WT. Teste t de Student. Os dados são expressos como a média em gráficos em box e whiskers (min -o max).

4.3. Teste de alternância em labirinto em Y

A fig.13. Ilustra o comportamento de camundongos machos dos grupos WT e bapa no labirinto em Y. A porcentagem de alternância dos camundongos machos bapa foi reduzida em relação ao grupo WT (Fig. A) porém o número de entradas nos braços do labirinto não foi diferente entre os dois grupos (Fig.B).

Fig.13. Teste de alternância em labirinto em Y de camundongos machos dos grupos WT e bapa.



A- Porcentagem de alternâncias de camundongos machos WT e bapa; B-frequência de entradas nos braços do labirinto de camundongos machos WT e bapa; N-5/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo WT. Teste t de Student. Os dados são expressos como a média em gráficos em box e whiskers (min -o max).

4.4. Teste de atenção baseado em objetos (OBAT)

A Fig 14 ilustra os resultados obtidos em camundongos machos WT e bapa no teste de atenção a novo objeto. A Anova de duas vias indicou que na frequência de interação com o objeto conhecido ou não os camundongos WT e bapa não apresentaram diferenças significantes. A duração em segundos de interação dos camundongos WT foi maior com o objeto novo do que com o desconhecido. Resultados opostos foram observados nos camundongos bapa, um vez que eles interagiram menos tempo com o objeto desconhecido do que com o conhecido. Os valores da análise estatística estão sob as figuras.

Fig.14. Teste de atenção baseado em objetos (OBAT) de camundongos machos WT e bapa.

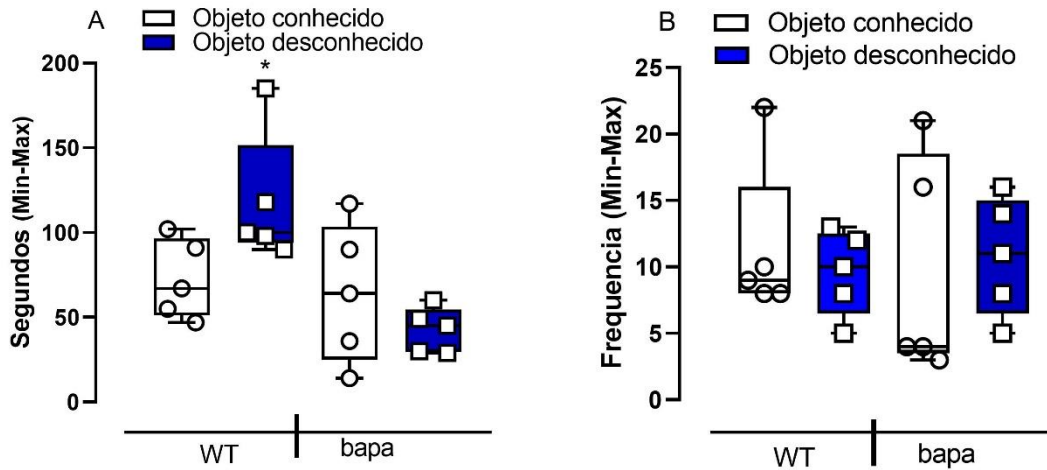
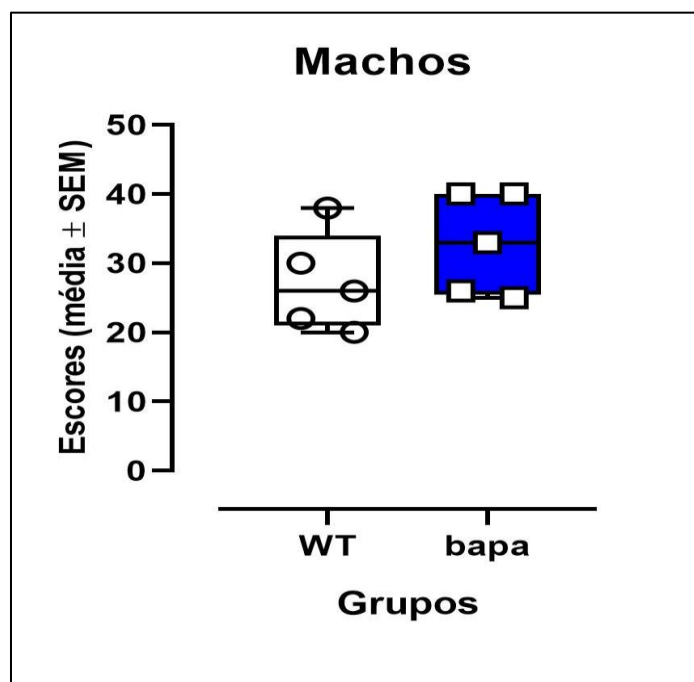


Fig. A- frequência de interação e B- tempo de interação com objetos desconhecidos e conhecidos. Os dados são expressos como a média em gráficos em box e whiskers (min -o max). N= 5/grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni.* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao objeto conhecido.

4.5. Teste de esquiva da altura

A fig.15. ilustra o comportamento no teste de esquiva da altura de camundongos WT e bapa machos. Os camundongos machos dos dois grupos apresentaram comportamento similar. Os valores da análise estatística estão sob as figuras.

Fig.15. Escores no teste de esquiva de altura de camundongos machos dos grupos WT e *bapa*.

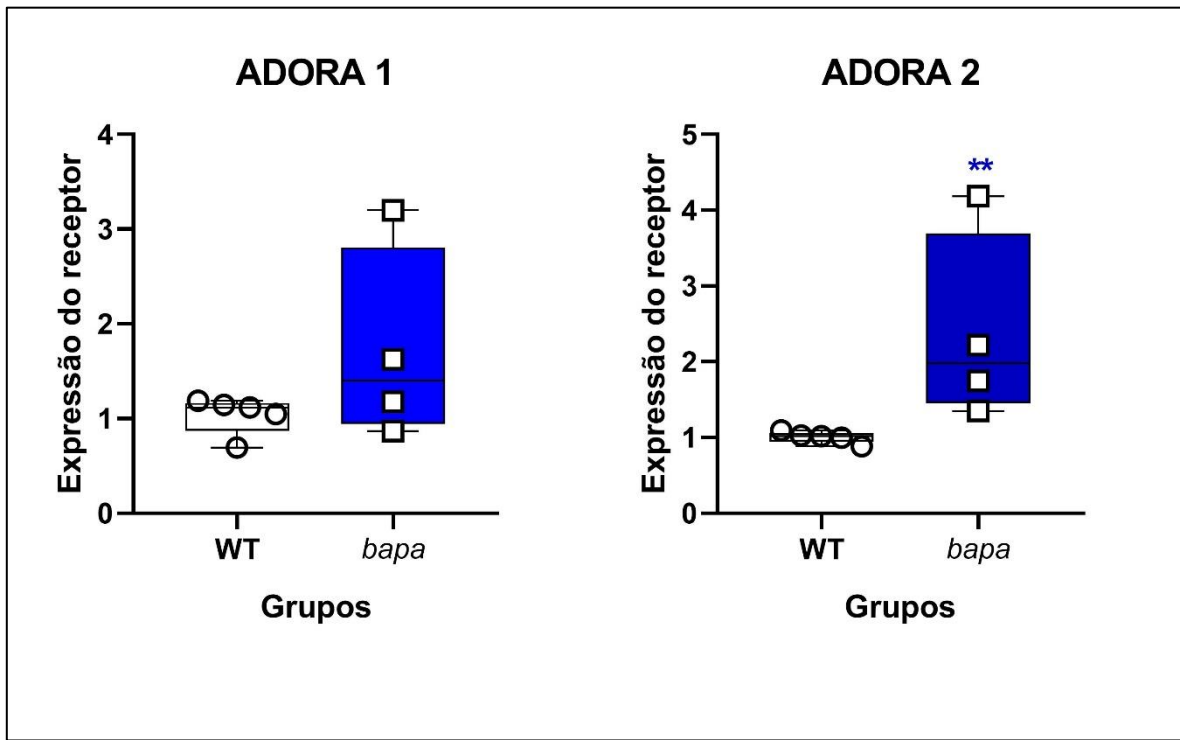


Escores de camundongos machos;. Os dados são expressos como a média em gráficos em box e whiskers (min -o max). N= 5/grupo. Teste t de Student $p^{**} < 0,01$ em relação ao grupo WT.

4.6. Expressão dos receptores ADORA 1 e ADORA 2 em camundongos machos WT e *bapa*.

A Fig.16 ilustra os resultados da expressão dos receptores ADORA 1 e ADORA 2 estriatais de camundongos machos *bapa* e WT. Não foi observada diferença significativa entre os grupos nas expressões do receptor ADORA 1 (Fig. A) porém houve aumento na expressão do receptor ADORA 2 (Fig. B) nos camundongos *bapa* em relação aos animais WT.

Fig.16. Expressão dos receptores ADORA 1 e ADORA 2 em camundongos WT e *bapa* machos.



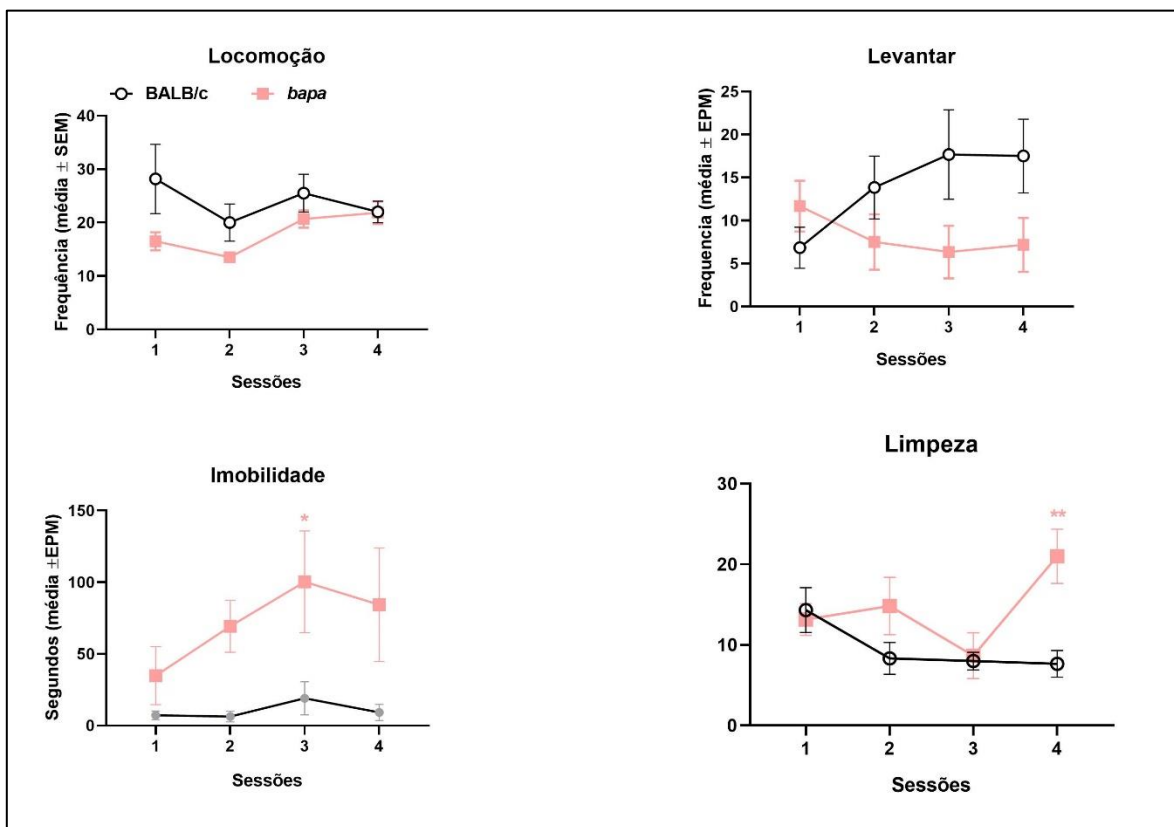
** $p < 0.01$. Teste U de Mann-Whitney.

ESTUDOS EM FÊMEAS

4.7. Atividade geral em campo aberto

A Fig.17. ilustra a atividade geral de camundongos *bapa* fêmeas observadas por 4 dias em sessões de 5 min. A RM ANOVA revelou redução das frequências de locomoção (Fig. A) e levantar (Fig. B) dos camundongos *bapa* fêmeas em relação aos camundongos WT. Inversamente a duração de imobilidade (Fig. C) e de limpeza (Fig. D) foram maiores nos camundongos *bapa* em relação àqueles WT.

Fig.17.Atividade geral de camundongos fêmeas WT ou *bapa* observadas no campo aberto por 4 dias consecutivos.

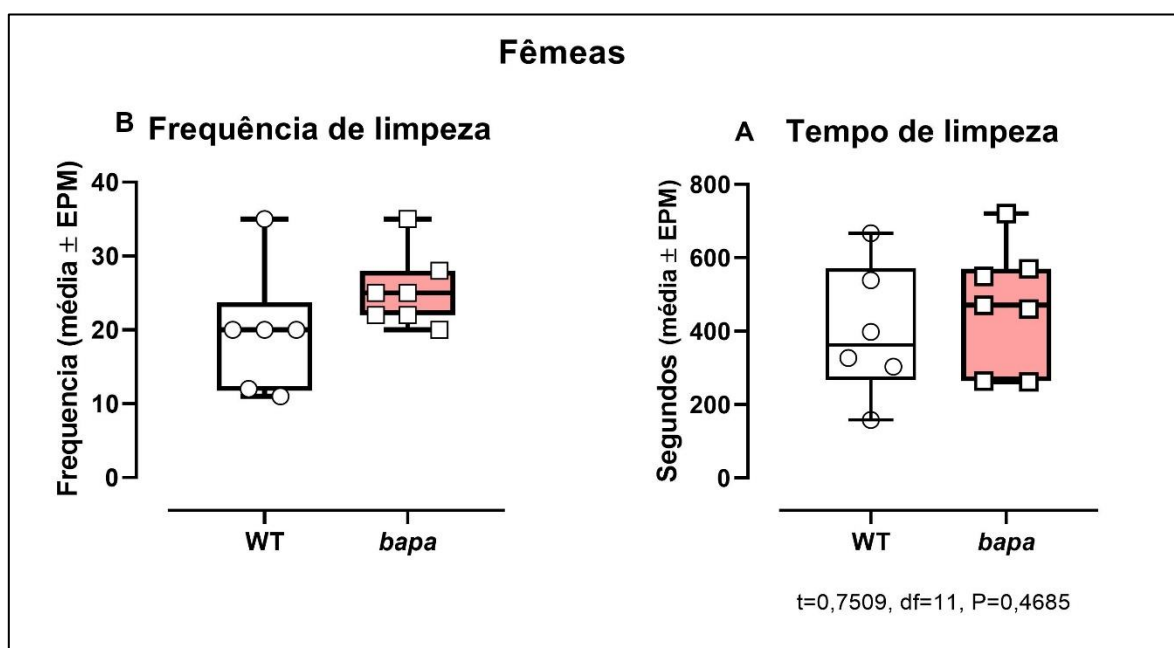


A- frequência de locomoção; B- frequência de levantar; C- duração em segundos da imobilidade; D- duração em segundos de limpeza.. Os dados são apresentados como média e respectivo erro-padrão. N- 6/grupo. RC ANOVA.

4.8. Comportamento de autolimpeza

A fig.18. Ilustra os parâmetros da limpeza de camundongos fêmeas dos grupos WT e bapa. Não se observou diferenças significantes entre os dois grupos tanto na frequência (Fig A) como na duração de limpeza (Fig.B). Os valores da análise estatística estão sob as figuras.

Fig.18. Frequência e duração de limpeza de camundongos machos dos grupos WT e *bapa*.



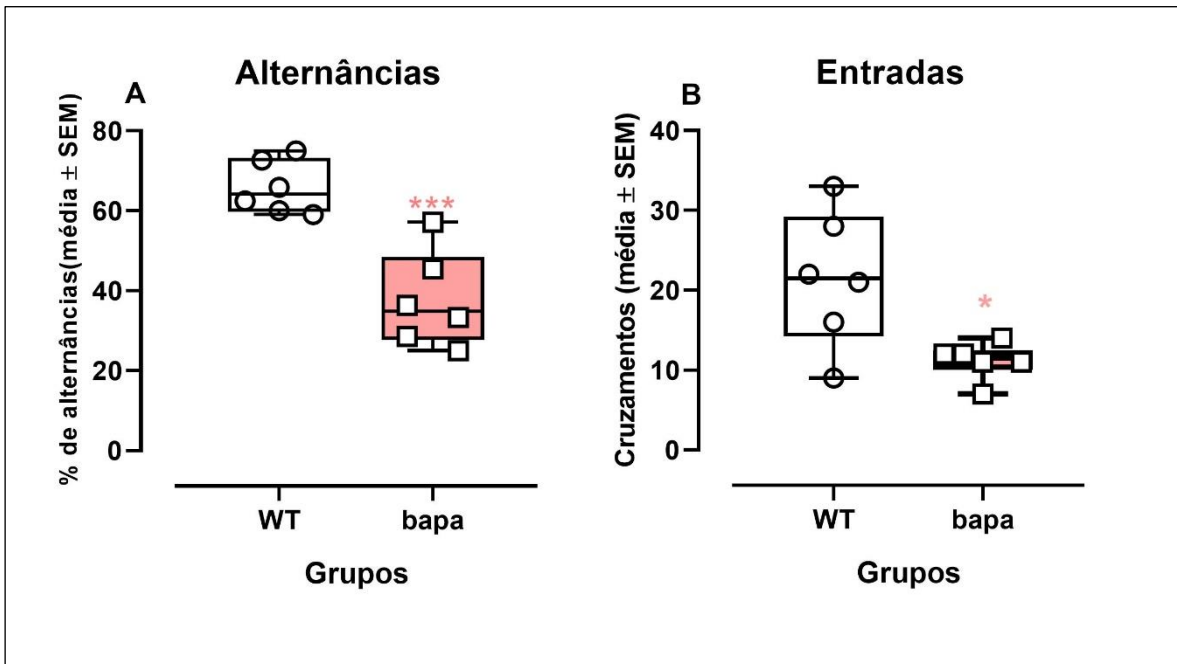
A-Frequência de limpeza de camundongos machos WT e bapa; B-Duração de limpeza em segundos de camundongos machos WT e bapa. N-6-6. * $p < 0,05$ em relação ao grupo WT. Teste t de Student. Os dados são expressos como a média em gráficos em box e whiskers (min -o max).

4.9. Teste de alternância em labirinto em Y

A fig.19. Ilustra o comportamento de camundongos fêmeas dos grupos WT e bapa no labirinto em Y. A respeito das fêmeas, verificou-se redução no número de alternância nos braços do labirinto das fêmeas (Fig. A) e redução do número de

cruzamentos no labirinto em Y (Fig. B). do grupo bapa em relação àquelas do grupo WT.

Fig.19. Teste de alternância em labirinto em Y de camundongos fêmeas dos grupos WT e *bapa*.



Porcentagem de alternâncias de camundongos fêmeas WT e *bapa*; frequência de entradas nos braços do labirinto de camundongos fêmeas WT e *bapa*; N-6-7grupo. * $p < 0,05$, *** $P < 0.001$ em relação ao grupo WT. Teste t de Student. Os dados são expressos como a média em gráficos em box e whiskers (min - max).

4.10. Teste de atenção baseado em objetos (OBAT) de camundongos machos WT e *bapa*.

A fig.20. ilustra os resultados obtidos em camundongos fêmeas WT e *bapa* no teste de atenção ao novo objeto. A Anova de duas vias indicou que houve redução na frequência de interação com o objeto desconhecido dos camundongos WT com relação ao conhecido. Os camundongos *bapa* não apresentaram diferenças significantes na frequência nos objetos (Fig. A).. A duração em segundos de interação dos camundongos WT foi similar em relação aos dois objetos, porém os

camundongos bapa mostraram aumento da interação com o objeto desconhecido em comparação do conhecido (Fig. B).

Fig.20. Teste de atenção baseado em objetos (OBAT) de camundongos fêmeas WT e *bapa*.

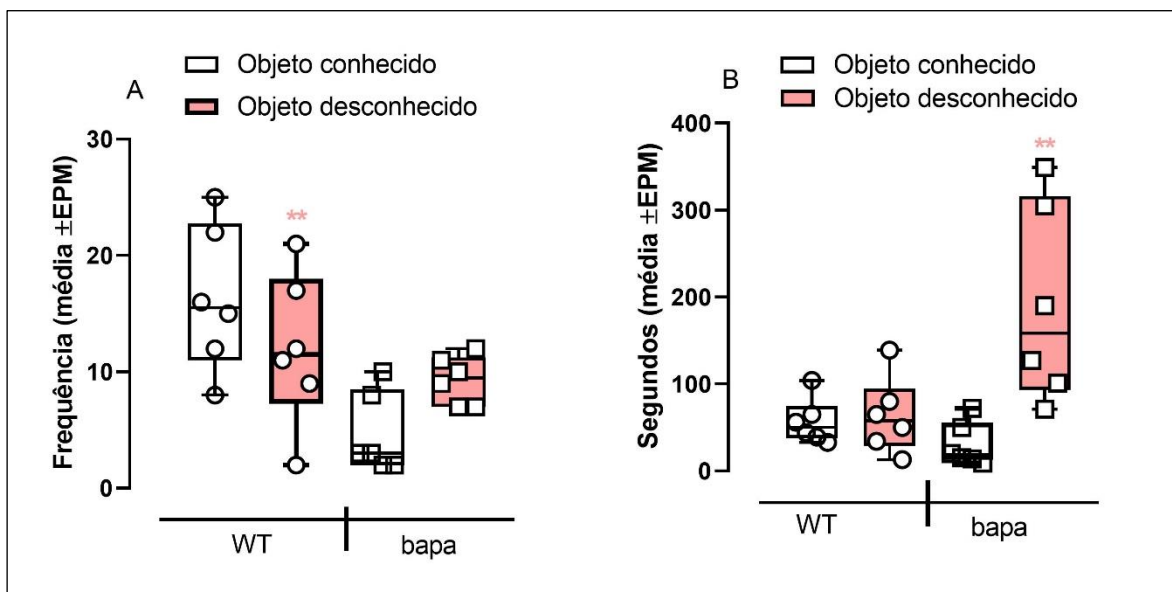
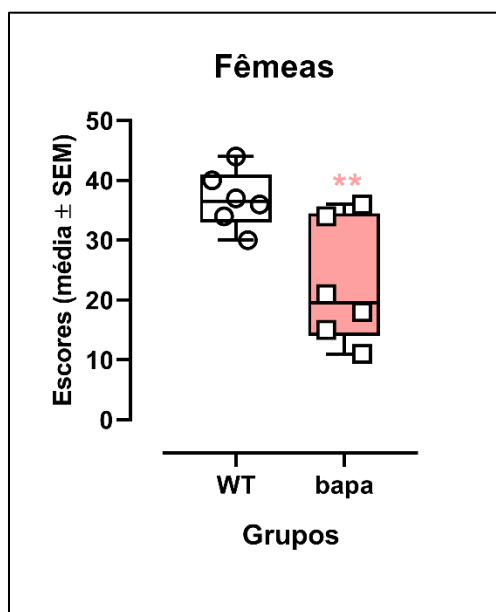


Fig. A- frequência de interação e B- tempo de interação com objetos desconhecidos e conhecidos. Os dados são expressos como a média em gráficos em box e whiskers (min - max). N= 6/grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni. $p < ** p < 0,01$ em relação ao objeto conhecido.

4.11. Teste de esquiva da altura

A fig.21. ilustra o comportamento no teste de esquiva da altura de camundongos WT e *bapa* fêmeas. As fêmeas *bapa*, mostraram menores escores do que aquelas do grupo WT.

Fig.21. Escores no teste de esqui de altura de camundongos fêmeas dos grupos WT e *bapa*.

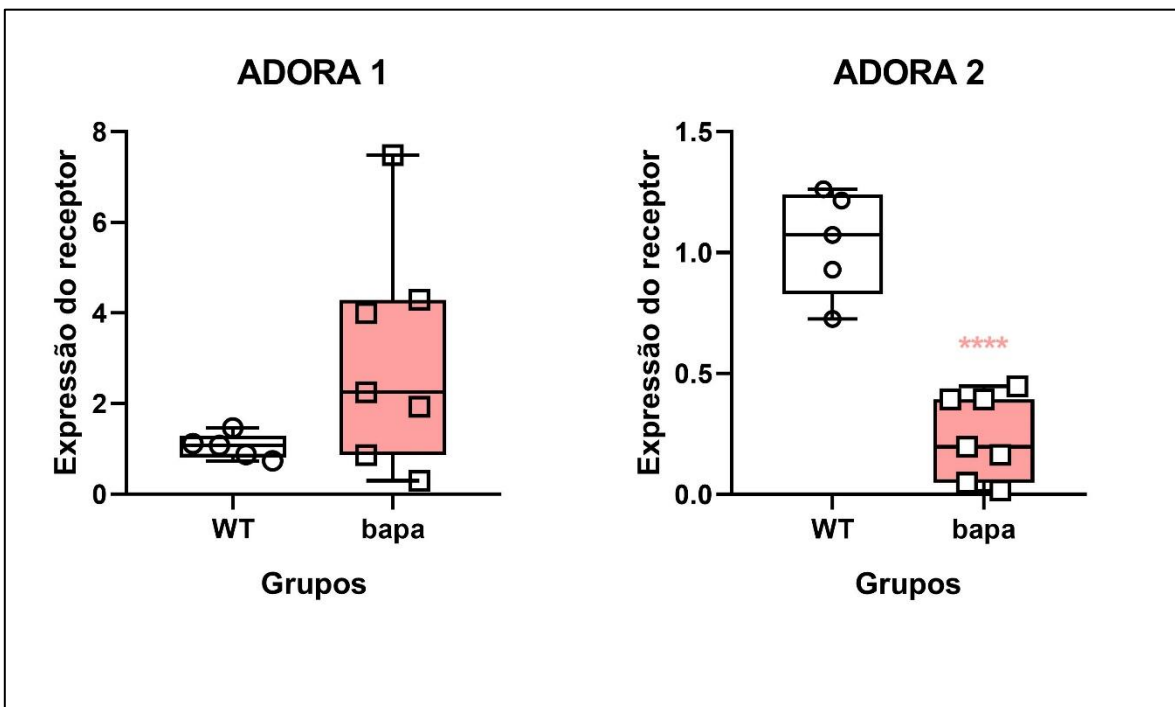


Escores de camundongos fêmeas;. Os dados são expressos como a média em gráficos em box e whiskers (min - max). N= 6/grupo. Teste t de Student $p^{**} p < 0,01$ em relação ao grupo WT.

4.12. Expressão dos receptores ADORA 1 e ADORA 2 em fêmeas.

A figura 22 ilustra a expressão dos receptores ADORA 1 e ADORA 2 de camundongos BALB/c e *bapa*. O teste *t* de Student indicou que os camundongos fêmeas *bapa* apresentaram menor expressão do receptor ADORA 2 em relação ao grupo controle WT (Fig. B). Por outro lado, não a diferenças significantes entre a expressão do receptor ADORA 1 entre os grupos (Fig. A).

Fig.22. Expressão dos receptores ADORA 1 e ADORA 2 estriatais de camundongos fêmeas dos grupos WT e *bapa*



Os dados são expressos como a média em gráficos em box e whiskers (min - max). N= 5/7grupo. **** $p < 0,001$ em relação ao grupo WT. Teste U de Mann-Whitney.

5. DISCUSSÃO

Dentre os diferentes modelos animais de TDHA destacam-se aqueles produzidos por mutações genéticas. Um dos mais utilizados são aqueles os ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) que foram desenvolvidos pela primeira vez em 1963 (85). Eles exibem hiperatividade e impulsividade, semelhantes aos sintomas do TDAH em humanos sendo empregados para investigar os mecanismos neurobiológicos e comportamentais subjacentes ao TDAH e para testar a eficácia de vários tratamentos para esse transtorno durante um longo período. No entanto, embora esses modelos sejam úteis, eles não mimetizam de forma completa a complexidade do TDHA e os dados obtidos devem ser interpretados cautelosamente.

Foram também desenvolvidos diversos modelos de animais de animais Knock-In/Out de um único gene ou transgênicos. Dentre esses modelos alguns deles apresentam um ou mais sintomas de TDHA ou alteram genes relacionados a neurotransmissores, como a dopamina, serotonina e noradrenalina. Estes modelos, apesar de suas limitações, são considerados os melhores modelos pois permitem estudos moleculares e os mecanismos de drogas no tratamento do TDHA. Dentre eles, destacam-se os camundongos knockout para o transportador de dopamina (DAT-KO) pois o sistema dopaminérgico está implicado no desenvolvimento do TDHA. Em particular, estes modelos são mais confiáveis pois estão baseados não apenas ao sistema de catecolaminas (transportador de dopamina, receptor de dopamina, e α -sinucleína), mas também aos sintomas semelhantes aos do TDAH.

Como a dopamina permanece mais tempo na sinapse devido à falta de seu transportador os camundongos DAT-KO apresentam hiperatividade. Além disso, eles exibem hiperatividade em campo aberto, apresentam déficit de atenção e impulsividade (86). No entanto, não há evidências de redução do DAT em pacientes com TDAH humano. Em vez disso, já foi observado aumento nos níveis de DAT no corpo estriado de adultos e crianças(36).(37)

Desta forma, a procura de um modelo animal de TDHA ainda é um campo a ser ainda investigado.

Yamamoto et al (87) caracterizaram o fenótipo do mutante bapa por meio de uma bateria de testes comportamentais utilizando os dados dos mutantes machos e fêmeas.. Assim, foram avaliados parâmetros relacionados a atividade geral, o sistema nervoso sensorial, o sistema psicomotor e o sistema nervoso autônomo. Foi ainda observada função motora e a memória espacial. Os resultados mostraram que em relação aos camundongos BALB/cJ, o mutante bapa apresentou deficiências, como hipotonia denotada por um comprometimento do reflexo de endireitamento, queda de membros posteriores e redução do reflexo auricular, sugerindo deficiência auditiva. Além disso, esses autores relataram maior atividade geral no campo aberto sugerindo a presença de hiperatividade. Ainda foi observada leve disfunção de coordenação motora no teste da trave elevada e modificações no padrão de marcha espacial.

Kirsten et al (88) observou que camundongos bapa apresentaram aumento no comportamento motor /exploratório na idade pré-pubere e sugeriu que seria consequência do aumento da expressão da tirosina hidroxilase estriatal levando a hiperatividade do sistema dopaminérgico. O aumento da atividade motora em campo aberto observado por 4 dias em camundongos bapa adultos foi também relatado por De-Oliviera-Higa, (89). Além disso, nesse trabalho, verificou-se que a administração de apomorfina, um agonista de receptores D1 e D2, promoveu aumento do comportamento estereotipado que foi atribuído a hiperatividade do receptor D1 estriatal. Portanto, pode-se inferir que a hiperatividade do camundongo bapa macho possa ser consequência da exacerbação do sistema dopaminérgico estriatal.

Além disso, sob certas condições experimentais de baixa estimulação, vários agonistas D1, incluindo SKF 82958, SKF 81297 e SKF 77434 (Murray e Waddington 1989) e agonistas D2/D3 incluindo quinpirole em doses que ativam receptores pós-sinápticos (Eilam et al. 1992), promovem aumento da locomoção. O envolvimento dos receptores D1 nos efeitos estimulantes dos agonistas D1 foi confirmado pois é

bloqueado por antagonistas D1 (Arnt et al. 1992). Ainda, esta estimulação não é observada em camundongos mutantes deficientes em receptores D1(90), comparados a camundongos do tipo selvagem.

Desta forma, pode-se atribuir a hiperatividade dos camundongos bapa macho em campo aberto (observada em ambiente de baixa estimulação), como resultado da maior atividade de receptores D1 dopaminérgicos(89).

O comportamento de autolimpeza observado em muitas espécies animais, especialmente roedores (91,92), é um comportamento inato que ocorre em uma progressão cefalo-caudal, começando com lambedura das patas, depois lavagem do nariz/rosto/cabeça, higiene corporal, lambedura das pernas e patas e, finalmente, limpeza cauda/genitais(93). Sua função primária em roedores é ligada à higienização e outros processos fisiológicos, como a termorregulação, comunicação social e estimulação(94) . A autolimpeza também pode ocorrer em situações de estresse, como um comportamento deslocado, ou em condições de baixos estímulos, como na habituação após exposições repetidas a ambientes novos.

Em vários modelos animais de distúrbios psiquiátricos a sequência da autolimpeza bem como sua intensidade são alteradas(93). Por exemplo a autolimpeza estereotipada é um dos principais sintomas em diversos modelos de roedores de autismo_(95) ansiedade e estresse(96) e em desordens do espectro obsessivo-compulsivo (97) .

Há evidências de que a autolimpeza é induzida pela administração de vários agonistas de receptores dopaminérgicos D1 mas não por agonistas de receptores dopaminérgicos D2 (98) , sendo bloqueado seletivamente por pré-tratamento com um antagonista D1 (99) . Portanto, também atribuímos o aumento da autolimpeza dos mutantes bapa a maior atividade do receptor dopaminérgico D1, confirmando as observações prévias de Oliveira-Higa. (100).

Note-se ainda que os camundongos machos bapa apresentaram este aumento somente no teste de autolimpeza, com apenas tendência ao final da

observação no campo aberto. Um dado importante são as diferenças entre os dois modelos foi o tempo de observação e a condição ambiental. No campo aberto os animais foram observados por 5 minutos enquanto no teste de autolimpeza por 30 minutos, o que pode ter facilitado a emissão do comportamento. Acrescente-se ainda que o campo aberto é uma arena que estimula o animal a explorá-lo enquanto na condição do teste de autolimpeza, o ambiente é restrito a uma caixa de vidro que apenas permite ao animal farejar suas paredes e voltar seu comportamento a si mesmo.

Portanto, até o momento, acreditamos que o aumento da hiperatividade no campo aberto e da autolimpeza possam ser consequência da hiperatividade do sistema dopaminérgico estriatal via receptores dopaminérgicos D1.

O comportamento de alternância espontânea no labirinto em Y, que avalia a atenção (101) e memória de trabalho(102) foi utilizado para medir o déficit de atenção dos camundongos bapa. Observou-se que machos bapa exibiram menor porcentagem de alternâncias mas mesma frequência de entradas nos braços do labirinto comparados aos camundongos WT. Esta redução nas alternâncias entre os braços aponta por uma menor atenção, porém sem modificação na atividade motora.

O teste de atenção baseado em objetos (OBAT) é um método simples e prático para avaliar a atenção em camundongos. Desde a sua criação, o teste tornou-se um método popular para avaliar a atenção e mecanismos subjacentes a vários modelos animais de doenças psiquiátricas(83). Wulaer et al.(103) verificaram que as áreas mais ativadas neste teste são o córtex pré-frontal, corpo estriado e o giro denteado(103), sendo que o córtex frontal e o estriado são áreas críticas na determinação das alterações reportadas no TDHA. Os presentes resultados observados do camundongo bapa neste teste são também compatíveis com um déficit atencional uma vez que os camundongos bapa não diferenciaram o objeto novo do já conhecido.

Estes resultados são compatíveis com uma série de trabalhos que relataram resultados similares em modelos animais de TDHA. Assim, os ratos espontaneamente hipertensivos (SHRs) exibiram comportamento, impulsivo, inibição da memória de trabalho em labirinto em Y bem como redução no teste de reconhecimento de objetos(104). Assim, os camundongos machos bapa, ao lado de hiperatividade, aumento da autolimpeza, também desenvolveram desatenção no labirinto em Y e no teste de atenção baseado em objetos.

No entanto, foi constatado que camundongos hipertensivos com aumento da expressão do gene do hormônio tireoidiano no estriado desenvolviam o fenótipo de desatenção no teste de reconhecimento de objetos e no labirinto em Y porém sem sinais de impulsividade (105)e hiperatividade. Estes animais ainda apresentavam maior expressão do transportador de dopamina, da tirosina-hidroxilase e do receptores D1 e D2 no estriado. De modo similar, o bapa também não mostrou alteração no teste de impulsividade porém eles apresentam aumento da expressão do receptor D1 (89)e da tirosina hidroxilase (88)estriatais além das alterações comportamentais acima citadas.

De acordo com o Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5ª edição (DSM-5),(106) há 3 tipos de TDHA: aquele em que a desatenção é predominante, com hiperatividade/impulsividade predominantes e o combinado.

O camundongo bapa macho poderia então, pela alterações comportamentais observados, ser classificado no grupo de hiperatividade/ desatenção sem impulsividade. No entanto, são necessários mais estudos para podermos confirmar a hipótese de que o camundongo macho bapa seja, pelo menos em parte, um modelo de déficit de TDHA.

A expressão do receptor ADORA 2 foi maior nos camundongos machos bapa. Os receptores ADORA 2 modulam os efeitos dos receptores da dopamina havendo antagonismo entre os receptores da adenosina e dopamina. Evidências adicionais também sugeriram facilitação pré-sináptica por receptores A2A da liberação de dopamina e outros neurotransmissores(107). Além disso,

camundongos knock-out de receptores ADORA2 apresentam atenuação das respostas comportamentais a psicoestimulantes(108). Uma série de estudos apontam os receptores de adenosina , em particular o receptor ADORA 2, alterado no TDHA sendo seu antagonista, a cafeína, efetiva no controle das alterações neste distúrbio(109). Portanto, o aumento da expressão do receptor ADORA 2 nos camundongos bapa macho pode ser implicado nos comportamentos TDHA- símile neste sexo.

No geral, o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH) é cerca de duas vezes mais comum em meninos do que em meninas, embora os índices variem de acordo com o tipo de distúrbio. O tipo predominantemente hiperativo/impulsivo ocorre 2 a 9 vezes mais entre os meninos, embora o tipo predominantemente desatento ocorra com igual frequência em ambos os sexos. As causas dessas diferenças, até o momento, ainda são desconhecidas(110).

Algumas evidências mostram que meninos são consideravelmente mais propensos a serem diagnosticados com TDAH do que meninas. Davies (2014)(111) propôs alguns mecanismos biológicos fundamentais, genéticos e endócrinos que poderiam teoricamente, contribuir para o dimorfismo sexual na expressão do TDHA. No entanto, dados conclusivos sobre estas diferenças ainda permanecem a serem entendidos como e por que os sexos diferem a respeito à vulnerabilidade do TDAH.

Já WILLIAMS ET AL (112) atribuem a maior prevalência do TDHA no sexo masculino pelas diferenças na proporção de receptores dopaminérgicos estriatais. Desta forma, durante o desenvolvimento, ocorre um aumento dos receptores de dopamina no estriado masculino, mas não feminino, paralelamente a ocorrência precoce dos sintomas motores do TDAH.

Assim verificamos que as fêmeas mostraram redução na atividade geral expressa apenas pelo aumento na imobilidade. Uma vez que as frequências de locomoção e levantar não foram alteradas nos quatro dias de observação, e que as fêmeas na última sessão de observação exibiram maior tempo de limpeza pode-se

propor que as fêmeas, por se habituar ao campo aberto, tenham voltado seu comportamento para si mesmas. Esta mudança de paradigma é tida como sinal de situações de baixo estresse(113) A ausência de diferenças entre os camundongos WT e bapa concorda com esta premissa. É importante notar que no campo aberto os camundongos fêmeas foram observados por 4 dias enquanto no teste de autolimpeza por apenas 30 minutos.

Os resultados das alternâncias no labirinto em Y mostraram que as fêmeas bapa apresentam maior atenção espacial. No entanto, o número de cruzamentos foi menor neste mutante. Este último dado pode ter sido consequência de uma menor atividade exploratória das fêmeas bapa, como observado no campo aberto.

O labirinto em Y pode também ser utilizado para avaliar a memória de curto prazo em roedores. A alternância espontânea, como medida da memória de trabalho espacial, pode ser avaliada permitindo que os animais explorem todos os três braços do labirinto sendo impulsionada pela curiosidade inata dos roedores em explorar áreas anteriormente não visitadas. Um rato com memória de trabalho intacta e, portanto, com funções corticais pré-frontais intactas, lembrar-se-á dos braços visitados anteriormente e mostrará uma tendência a entrar num braço visitado menos recentemente(114).

No teste de atenção a objeto novo, também as fêmeas bapa ficaram mais tempo farejando o objeto novo indicando que a atenção delas estava preservada. Ainda, o teste de atenção a um objeto novo também está também relacionado a memória de trabalho(115). Portanto, tomando-se em conjunto os dados das fêmeas bapa no labirinto em Y e no teste de atenção a objeto novo podem ser interpretados sob a ótica da cognição. Neste sentido, a atenção tem um papel crítico na cognição. Fato interessante é que os animais do grupo WT não reconheceram o objeto novo, como seria esperado, e frequentaram menos a área do objeto desconhecido.

Da mesma forma, que os camundongos machos, as fêmeas mostraram redução nos escores em relação ao grupo controle indicativo de menor impulsividade.

Nas fêmeas bapa a expressão do receptor ADORA 2 está reduzida enquanto a do receptor ADORA1 está preservada. Portanto, pode-se propor que a redução da expressão do que receptor ADORA 2 esteja ligada, pelo menos em parte, a ausência de sinais de déficit de atenção nestes mutantes. A respeito do receptor ADORA1, já se mostrou seu envolvimento com a plasticidade sináptica nos processos de aprendizado/memória(116,117), explicando os presentes resultados

3. Conclusões

Os resultados obtidos mostraram que os camundongos bapa machos e fêmeas exibiram um perfil comportamental distinto embora ambos tenham a mesma mutação. Neste sentido, da análise dos comportamento dos bapa machos é indicativa da ocorrência de hiperatividade e déficit de atenção. Por outro lado, o perfil comportamental das fêmeas mostra redução da atividade geral, melhor desempenho nos teste do labirinto em Y e de atenção a objetos novos sugerindo melhora nos processos de aprendizado/memória. Finalmente, estes resultados mostram que a mutação do gene Km2d afetou de forma diferente o comportamento de camundongos machos e fêmeas mutantes, provavelmente por alterações epigenéticas ligadas aos hormônios sexuais

Conclui-se então que em:

1. **Camundongos machos bapa** apresentaram em relação àqueles WT:
 - ✓ Nos testes comportamentais- Hiperatividade, Comportamento compulsivo, déficit na atenção espacial e de objeto novo com ausência de impulsividade.
 - ✓ Aumento na expressão do receptor ADORA 2 em relação ao camundongo WT enquanto a expressão do receptor ADORA 1 não foi alterada.

2. **Camundongos fêmeas bapa** apresentaram em relação àqueles WT:
 - ✓ Nos testes comportamentais: redução da atividade geral, ausência de comportamento compulsivo, melhor desempenho do testes de atenção espacial e de objeto novo com ausência de impulsividade.
 - ✓ Redução na expressão do receptor ADORA 2 sem alteração na expressão do receptor ADORA 1.

6. REFERENCIAS

1. Ferreira L, Ferreira L. Experimental model: historic and conceptual revision. *Acta Cir Bras*. 2003;18(n.spe):1–3.
2. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir Bras* [Internet]. 2005;20(Supl.2):28–34. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16283025>
3. Santos B. Classificação dos animais de laboratório quanto ao status genético. Em: Andrade A, Pinto R, Oliveira R, organizadores. *Animais de Laboratório – criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p. 211–24.
4. Abdelhay E. Criação e produção de animais transgênicos e nocaute. Em: Andrade A, Pinto S, Oliveira R, organizadores. *Animais de Laboratório – criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p. 325–352.
5. Bult CJ, Eppig JT, Blake JA, Kadin JA, Richardson JE. The Mouse Genome Database: Genotypes, Phenotypes, and Models of Human Disease. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1º de janeiro de 2013;41(D1):D885–91. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gks1115>
6. Adams DJ, Doran AG, Lilue J, Keane TM. The Mouse Genomes Project: a repository of inbred laboratory mouse strain genomes. *Mammalian Genome* [Internet]. 30 de outubro de 2015;26(9–10):403–12. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00335-015-9579-6>
7. Guénet JL. The mouse genome. *Genome Res* [Internet]. dezembro de 2005;15(12):1729–40. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.3728305>
8. Bult CJ, Eppig JT, Blake JA, Kadin JA, Richardson JE. The Mouse Genome Database: Genotypes, Phenotypes, and Models of Human Disease. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1º de janeiro de 2013;41(D1):D885–91. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gks1115>
9. Justice MJ. Mouse ENU Mutagenesis. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1º de setembro de 1999;8(10):1955–63. Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/8.10.1955>
10. Shibuya T, Morimoto K. A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* [Internet]. julho de 1993;297(1):3–38. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165111093900058>

11. Justice MJ. Capitalizing on large-scale mouse mutagenesis screens. *Nat Rev Genet* [Internet]. novembro de 2000;1(2):109–15. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35038549>
12. Justice MJ. Capitalizing on large-scale mouse mutagenesis screens. *Nat Rev Genet* [Internet]. novembro de 2000;1(2):109–15. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35038549>
13. Massironi SMG, Reis BLFS, Carneiro JG, Barbosa LBS, Ariza CB, Santos GC, et al. Inducing mutations in the mouse genome with the chemical mutagen ethylnitrosourea. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006;39(9):1217–26.
14. Hurler B. Non-syndromic vestibular disorder with otoconial agenesis in tilted/mergulhador mice caused by mutations in otopetrin 1. *Hum Mol Genet*. 1º de abril de 2003;12(7):777–89.
15. MORI C, REIS B, GODARD A, DAGLI M, MASSIRONI S. Histopathological Description of Skin and Hair Follicle Development in Mutant Careca Mice Induced by Ethyl Nitroso Urea. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2006;45:130–1.
16. SALVAGNI F, PEREIRA N, MORI C, MASSIRONI S, PINTO FAC. Caracterização do Processo Cicatricial na pele de camundongos mutantes induzidos por Ethylnitrosourea. Em: XI CONGRESSO BRASILEIRO EM CIÊNCIAS DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO. 2009. p. CDR-RESUMOS.
17. TORRES A, MASSIRONI S, GUÉNET J, GODARD A. Validação do camundongo rodador como modelo para Síndrome de Usher-tipo 1F (USH1F), desordem genética humana caracterizada por deficiência auditiva e retinite pigmentosa. Em: 56º Congresso Brasileiro de Genética, Guarujá. Guarujá, SP; 2010.
18. Arisa C. Mutação eq1b causa alteração na expressão de genes do controle do ciclo celular de precursores de neurônios cerebelares. Universidade Federal de São Paulo.; 2011.
19. Massironi SMG, Reis BLFS, Carneiro JG, Barbosa LBS, Ariza CB, Santos GC, et al. Inducing mutations in the mouse genome with the chemical mutagen ethylnitrosourea. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006;39(9):1217–26.
20. Yamamoto PK, Souza TA, Antiorio ATFB, Zanatto DA, Garcia-Gomes M de SA, Alexandre-Ribeiro SR, et al. Genetic and behavioral characterization of a Kmt2d mouse mutant, a new model for Kabuki Syndrome. *Genes Brain Behav* [Internet]. 23 de novembro de 2019;18(8). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/gbb.12568>

21. Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, et al. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013;161(9):2234–43.
22. Bögershausen N, Gatinois V, Riehmer V, Kayserili H, Becker J, Thoenes M, et al. Mutation Update for Kabuki Syndrome Genes KMT2D and KDM6A and Further Delineation of X-Linked Kabuki Syndrome Subtype 2. *Hum Mutat* [Internet]. setembro de 2016;37(9):847–64. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.23026>
23. Bögershausen N, Wollnik B. Unmasking Kabuki syndrome. Vol. 83, *Clinical Genetics*. 2013. p. 201–11.
24. Caciolo C, Alfieri P, Piccini G, Digilio MC, Lepri FR, Tartaglia M, et al. Neurobehavioral features in individuals with Kabuki syndrome. *Mol Genet Genomic Med* [Internet]. maio de 2018;6(3):322–31. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.348>
25. Makrythanasis P, van Bon B, Steehouwer M, Rodríguez-Santiago B, Simpson M, Dias P, et al. MLL2 mutation detection in 86 patients with Kabuki syndrome: a genotype-phenotype study. *Clin Genet* [Internet]. dezembro de 2013;84(6):539–45. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.12081>
26. Schott DA, Blok MJ, Gerver WJM, Devriendt K, Zimmermann LJI, Stumpel CTRM. Growth pattern in Kabuki syndrome with a KMT2D mutation. *Am J Med Genet A*. 1º de dezembro de 2016;170(12):3172–9.
27. Rittinger O. Niikawa-Kuroki (Kabuki) syndrome in a 13 year old Austrian boy. *Monatsschrift Kinderheilkunde*. 2001;149(6):579–81.
28. Mervis CB, Becerra AM, Rowe ML, Hersh JH, Morris CA. Intellectual abilities and adaptive behavior of children and adolescents with Kabuki syndrome: A preliminary study. *Am J Med Genet A* [Internet]. 30 de janeiro de 2005;132A(3):248–55. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.a.30334>
29. van Dongen LCM, Wingbermühle PAM, van der Veld WM, Stumpel C, Kleefstra T, Egger JIM. Exploring the cognitive phenotype of Kabuki (Niikawa–Kuroki) syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research* [Internet]. 6 de junho de 2019;63(6):498–506. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jir.12597>
30. Niikawa N, Matsuura N, Fukushima Y, Ohsawa T, Kajii T. Kabuki make-up syndrome: A syndrome of mental retardation, unusual facies, large and protruding ears, and postnatal growth deficiency. *J Pediatr* [Internet]. outubro de 1981;99(4):565–9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347681802557>
31. Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, et al. Overview of Histone Modification. Em 2021. p. 1–16. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-981-15-8104-5_1

32. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. setembro de 2016;8(9):a019505. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a019505>
33. Cao F, Chen Y, Cierpicki T, Liu Y, Basrur V, Lei M, et al. An Ash2L/RbBP5 Heterodimer Stimulates the MLL1 Methyltransferase Activity through Coordinated Substrate Interactions with the MLL1 SET Domain. *Bryk M, organizador. PLoS One* [Internet]. 23 de novembro de 2010;5(11):e14102. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0014102>
34. Klonou A, Chlamydas S, Piperi C. Structure, Activity and Function of the MLL2 (KMT2B) Protein Lysine Methyltransferase. *Life* [Internet]. 12 de agosto de 2021;11(8):823. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-1729/11/8/823>
35. Negri G, Magini P, Milani D, Crippa M, Biamino E, Piccione M, et al. Exploring by whole exome sequencing patients with initial diagnosis of Rubinstein–Taybi syndrome: the interconnections of epigenetic machinery disorders. *Hum Genet* [Internet]. 26 de março de 2019;138(3):257–69. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-019-01985-y>
36. Sakata S, Okada S, Aoyama K, Hara K, Tani C, Kagawa R, et al. Individual Clinically Diagnosed with CHARGE Syndrome but with a Mutation in KMT2D, a Gene Associated with Kabuki Syndrome: A Case Report. *Front Genet* [Internet]. 11 de dezembro de 2017;8. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2017.00210/full>
37. Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet* [Internet]. 31 de abril de 2013;132(4):359–83. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-013-1271-x>
38. Lavery WJ, Barski A, Wiley S, Schorry EK, Lindsley AW. KMT2C/D COMPASS complex-associated diseases [KCD-COM-ADs]: an emerging class of congenital regulopathies. *Clin Epigenetics* [Internet]. 10 de dezembro de 2020;12(1):10. Disponível em: <https://clinicaledgejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-019-0802-2>
39. Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, Mcmillin MJ, et al. Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2011;155(7):1511–6.
40. Kirsten TB, Silva EP, Biondi TF, Rodrigues PS, Cardoso C V., Massironi SMG, et al. Bate palmas mutant mice as a model of Kabuki syndrome: Higher susceptibility to infections and vocalization impairments? *J Neurosci Res* [Internet]. julho de 2022;100(7):1438–51. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.25050>
41. Vieira Caliman L. Artigo 46 Notas Sobre a História Oficial do Transtorno do Déficit de Atenção/hiperatividade TDAH Notes on the Official History of Attention

Deficit/hyperactivity Disorder ADHD Anotaciones Sobre la Historia Oficial del Trastorno del Déficit de Atención/hip. 2010.

42. Couto T, De Meloo-Junioer M, De Araujo Gomes C. Aspectos neurobiológicos do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH): uma revisão. *Ciênc cogn* [online]. 2010;15(1):241–51.
43. Kessi M, Duan H, Xiong J, Chen B, He F, Yang L, et al. Attention-deficit/hyperactive disorder updates. Vol. 15, *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2022.
44. PoetaLS, Rosa Neto F. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2004. p. 150–5 Estudo epidemiológico dos sintomas do transtorno do déficit de atenção/hiperatividade e transtornos de comportamento em escolares da rede pública de Florianópolis usando a EDAH.
45. Faraone S V., Banaschewski T, Coghill D, Zheng Y, Biederman J, Bellgrove MA, et al. The World Federation of ADHD International Consensus Statement: 208 Evidence-based conclusions about the disorder. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. setembro de 2021;128:789–818. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014976342100049X>
46. American Psychiatric Association. <http://www.psych.org/MainMenu/Research/DSMIV.aspx>. 1994. DSM-IV. Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders.
47. Andrade E, Scheuer C. Análise da eficácia do metilfenidato usando a versão abreviada do questionário de Conners em Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade. *Revista Arquivos de Neuropsiquiatria*. 2004;62(1):81–5.
48. Ciasca SM, Capellini AS, Toledo MM, Simão NA, Ferreira TL. Transtorno de déficit de atenção com hiperatividade: abordagem neurobiológica. *Revista Brasileira de Neurologia* [Internet]. 2007;48(3):11–3. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-513285>
49. Desidério RCS, Cristina M, Miyazaki OS. Sugestões Práticas Transtorno de Déficit de Atenção / Hiperatividade (TDAH): Orien-tações para a Família.
50. Austerman J. ADHD and behavioral disorders: Assessment, management, and an update from DSM-5. *Cleve Clin J Med*. 2015;82:2–7.
51. Katzman MA, Bilkey TS, Chokka PR, Fallu A, Klassen LJ. Adult ADHD and comorbid disorders: Clinical implications of a dimensional approach. Vol. 17, *BMC Psychiatry*. BioMed Central Ltd.; 2017.
52. Bouchatta O, Manouze H, Bouali-benazzouz R, Kerekes N, Ba-M’hamed S, Fossat P, et al. Neonatal 6-OHDA lesion model in mouse induces Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD)-like behaviour. *Sci Rep*. 1º de dezembro de 2018;8(1).

53. Smith DR, Strupp BJ. Animal Models of Childhood Exposure to Lead or Manganese: Evidence for Impaired Attention, Impulse Control, and Affect Regulation and Assessment of Potential Therapies. Vol. 20, *Neurotherapeutics*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023. p. 3–21.
54. GENES tdhdownload.
55. Faraone S V., Larsson H. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. Vol. 24, *Molecular Psychiatry*. Nature Publishing Group; 2019. p. 562–75.
56. Sharma A, Couture J. A review of the pathophysiology, etiology, and treatment of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Ann Pharmacother*. fevereiro de 2014;48(2):209–25.
57. Archer T, Oscar-Berman M, Blum K. Epigenetics in Developmental Disorder: ADHD and Endophenotypes. Vol. 30, *J Genet Syndr Gene Ther*. 2011.
58. Cortese S, Adamo N, Del Giovane C, Mohr-Jensen C, Hayes AJ, Carucci S, et al. Comparative efficacy and tolerability of medications for attention-deficit hyperactivity disorder in children, adolescents, and adults: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Psychiatry* [Internet]. setembro de 2018;5(9):727–38. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215036618302694>
59. Volkow ND, Wang GJ, Newcorn J, Fowler JS, Telang F, Solanto M V., et al. Brain dopamine transporter levels in treatment and drug naïve adults with ADHD. *Neuroimage* [Internet]. fevereiro de 2007;34(3):1182–90. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S105381190601024X>
60. Rubia K, Halari R, Cubillo A, Mohammad AM, Brammer M, Taylor E. Methylphenidate normalises activation and functional connectivity deficits in attention and motivation networks in medication-naïve children with ADHD during a rewarded continuous performance task. *Neuropharmacology* [Internet]. dezembro de 2009;57(7–8):640–52. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390809002792>
61. GUVEN A, ALTINKAYNAK M, DOLU N, DEMIRCI E, OZMEN S, IZZETOGLU M, et al. Effects of methylphenidate on reaction time in children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Archives of Neuropsychiatry* [Internet]. 2018; Disponível em: <http://submission.noropsikiyatriarsivi.com/default.aspx?s=public~kabul&mId=22873>
62. Faraone S V., Asherson P, Banaschewski T, Biederman J, Buitelaar JK, Ramos-Quiroga JA, et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 6 de agosto de 2015;1(1):15020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201520>
63. Knouse LE, Teller J, Brooks MA. Meta-analysis of cognitive–behavioral treatments for adult ADHD. *J Consult Clin Psychol* [Internet]. julho de 2017;85(7):737–50. Disponível em: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/ccp0000216>

64. Scionti N, Cavallero M, Zogmaister C, Marzocchi GM. Is Cognitive Training Effective for Improving Executive Functions in Preschoolers? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Psychol* [Internet]. 10 de janeiro de 2020;10. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsyg.2019.02812/full>
65. Rimestad ML, Lambek R, Zacher Christiansen H, Hougaard E. Short- and Long-Term Effects of Parent Training for Preschool Children With or at Risk of ADHD: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Atten Disord* [Internet]. 14 de março de 2019;23(5):423–34. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1087054716648775>
66. Li L, Taylor MJ, Bälter K, Kuja-Halkola R, Chen Q, Hegvik T, et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms and dietary habits in adulthood: A large population-based twin study in Sweden. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* [Internet]. 7 de dezembro de 2020;183(8):475–85. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.b.32825>
67. Hyman SE. Addiction to Cocaine Minireview and Amphetamine. Vol. 16, *Neuron*. 1996.
68. Anas Sohail A, Ortiz F, Varghese T, Fabara SP, Batth AS, Sandesara DP, et al. The Cognitive-Enhancing Outcomes of Caffeine and L-theanine: A Systematic Review. *Cureus*. 30 de dezembro de 2021;
69. Vázquez JC, Martín de la Torre O, López Palomé J, Redolar-Ripoll D. Effects of Caffeine Consumption on Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) Treatment: A Systematic Review of Animal Studies. Vol. 14, *Nutrients*. MDPI; 2022.
70. Domenici MR, Ferrante A, Martire A, Chiodi V, Pepponi R, Tebano MT, et al. Adenosine A2A receptor as potential therapeutic target in neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Res*. setembro de 2019;147:104338.
71. Fraporti TT, Contini V, Tovo-Rodrigues L, Recamonde-Mendoza M, Rovaris DL, Rohde LA, et al. Synergistic effects between ADORA2A and DRD2 genes on anxiety disorders in children with ADHD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 13 de julho de 2019;93:214–20.
72. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol Rev* [Internet]. 2018;98:1591–625. Disponível em: www.canfite.com.
73. Bouchatta O, Manouze H, Bouali-benazzouz R, Kerekes N, Ba-M'hamed S, Fossat P, et al. Neonatal 6-OHDA lesion model in mouse induces Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD)-like behaviour. *Sci Rep*. 1º de dezembro de 2018;8(1).
74. Russell VA. Overview of animal models of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Curr Protoc Neurosci*. janeiro de 2011;Chapter 9:Unit9.35.

75. Sagvolden T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neurosci Biobehav Rev.* janeiro de 2000;24(1):31–9.
76. Bayless DW, Perez MC, Daniel JM. Comparison of the validity of the use of the spontaneously hypertensive rat as a model of attention deficit hyperactivity disorder in males and females. *Behavioural brain research.* 1º de junho de 2015;286:85–92.
77. Heal DJ, Smith SL, Kulkarni RS, Rowley HL. New perspectives from microdialysis studies in freely-moving, spontaneously hypertensive rats on the pharmacology of drugs for the treatment of ADHD. *Pharmacol Biochem Behav.* agosto de 2008;90(2):184–97.
78. Sora I, Wichems C, Takahashi N, Li XF, Zeng Z, Revay R, et al. Cocaine reward models: Conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice [Internet]. Vol. 95, *Neurobiology.* 1998. Disponível em: www.pnas.org.
79. Hess EJ, Jinnah HA, Kozak CA, Wilson MC. Spontaneous Locomotor Hyperactivity in a Mouse Mutant with a Deletion Including the Snap Gene on Chromosome 2. Vol. 12, *The Journal of Neuroscience.* 1992.
80. Kalueff A V., Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2015;17(1):45–59. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn.2015.8>
81. Kalueff A V., Tuohimaa P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols.* 2004;13(3):151–8.
82. Zhang L, Levenson CW, Salazar VC, McCarthy DM, Biederman J, Zafonte R, et al. Repetitive Mild Traumatic Brain Injury in a Perinatal Nicotine Exposure Mouse Model of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Dev Neurosci* [Internet]. 2021;43(1):63–72. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/515198>
83. Alkam T, Hiramatsu M, Mamiya T, Aoyama Y, Nitta A, Yamada K, et al. Evaluation of object-based attention in mice. *Behavioural Brain Research* [Internet]. junho de 2011;220(1):185–93. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432811000799>
84. Carbajal MS, Bounmy AJC, Harrison OB, Nolen HG, Regan SL, Williams MT, et al. Impulsive choice in two different rat models of ADHD—Spontaneously hypertensive and Lphn3 knockout rats. *Front Neurosci.* 26 de janeiro de 2023;17.
85. Sagvolden T, Johansen EB. Rat Models of ADHD. Em: *Curr Top Behav Neurosci* [Internet]. 2011. p. 301–15. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/7854_2011_126

86. Lee WS, Yoon BE. Necessity of an Integrative Animal Model for a Comprehensive Study of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Vol. 11, *Biomedicines*. MDPI; 2023.
87. Yamamoto PK, Souza TA, Antiorio ATFB, Zanatto DA, Garcia-Gomes M de SA, Alexandre-Ribeiro SR, et al. Genetic and behavioral characterization of a *Kmt2d* mouse mutant, a new model for Kabuki Syndrome. *Genes Brain Behav* [Internet]. 23 de abril de 2019;18(8):e12568. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/gbb.12568>
88. Kirsten TB, Silva EP, Biondi TF, Rodrigues PS, Cardoso C V., Massironi SMG, et al. Bate palmas mutant mice as a model of Kabuki syndrome: Higher susceptibility to infections and vocalization impairments? *J Neurosci Res* [Internet]. julho de 2022;100(7):1438–51. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.25050>
89. de Oliveira-Higa MA, da Silva Rodrigues P, Sampaio ACS, de Camargo Coque A, Kirsten TB, Massironi SMG, et al. The dopaminergic D1 receptor modulates the hyperactivity of bapa mutnat mice. *Behavioural Brain Research*. agosto de 2023;114562.
90. Apostolakis EM, Garai J, Fox C, Smith CL, Watson SJ, Clark JH, et al. Dopaminergic Regulation of Progesterone Receptors: Brain D5 Dopamine Receptors Mediate Induction of Lordosis by D1-Like Agonists in Rats. 1996.
91. Arakawa H. Implication of the social function of excessive self-grooming behavior in BTBR T+Itpr3tf/J mice as an idiopathic model of autism. *Physiol Behav*. 1º de agosto de 2021;237.
92. Askari-Zahabi K, Abbasnejad M, Kooshki R, Esmaili-Mahani S. Orexin one receptors within the basolateral amygdala are involved in the modulation of cognitive deficits associated with a migraine-like state in rats. *Neurol Res*. 2021;43(12):1087–97.
93. Kalueff A V, LaPorte JL, Bergner CL. *Neurobiology of Grooming Behavior*. [Internet]. *Neurobiology of Grooming Behavior*. Cambridge University Press; 2010. 298 p. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80053547934&partnerID=40&md5=4bd92b576a5a028851e1e02366ed0d03>
94. Kalueff A V, Lou YR, Laaksi I, Tuohimaa P. Abnormal behavioral organization of grooming in mice lacking the vitamin D receptor gene. *J Neurogenet* [Internet]. 2005;19(1):1–24. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16076629>
95. Peça J, Feliciano C, Ting JT, Wang W, Wells MF, Venkatraman TN, et al. *Shank3* mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* [Internet]. 2011;472(7344):437–42. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3090611&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

96. Estanislau C. Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. *Psychol Neurosci*. 2012;
97. Ahmari SE, Dougherty DD. DISSECTING OCD CIRCUITS: From ANIMAL MODELS to TARGETED TREATMENTS. Vol. 32, *Depression and Anxiety*. 2015. p. 550–62.
98. Starr BS, Starr MS. Differential effects of dopamine D1 and D2 agonists and antagonists on velocity of movement, rearing and grooming in the mouse. *Neuropharmacology*. maio de 1986;25(5):455–63.
99. Molloy AG, Waddington JL. Pharmacological characterization in the rat of grooming and other behavioural responses to the D1 dopamine receptor agonist R-SK&F 38393. *Journal of Psychopharmacology*. 1º de maio de 1987;1(3):177–83.
100. de Oliveira-Higa MA, da Silva Rodrigues P, Sampaio ACS, de Camargo Coque A, Kirsten TB, Massironi SMG, et al. The dopaminergic D1 receptor modulates the hyperactivity of Bapa mutant mice. *Behavioural Brain Research* [Internet]. agosto de 2023;452:114562. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432823002802>
101. Katz R, SCHRIAL K. DOPAMINERGIC INVOLVEMENT IN ATTENTION A NOVEL ANIMAL MODEL1. Pergamon Press Ltd; 1981.
102. Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist fl-carbolines. Vol. 94, *Psychopharmacology*. 1988.
103. Wulaer B, Kunisawa K, Kubota H, Suento WJ, Saito K, Mouri A, et al. Prefrontal cortex, dorsomedial striatum, and dentate gyrus are necessary in the object-based attention test in mice. *Mol Brain*. 1º de dezembro de 2020;13(1).
104. Kantak KM. Rodent models of attention-deficit hyperactivity disorder: An updated framework for model validation and therapeutic drug discovery. *Pharmacol Biochem Behav*. maio de 2022;216:173378.
105. Custodio RJP, Botanas CJ, de la Peña JB, dela Peña IJ, Kim M, Sayson LV, et al. Overexpression of the Thyroid Hormone-Responsive (THRSP) Gene in the Striatum Leads to the Development of Inattentive-like Phenotype in Mice. *Neuroscience*. 15 de outubro de 2018;390:141–50.
106. American Psychiatry Association Apa. DSM-V-TR - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. 5a. Ed. Rev. 2013. 992 p.
107. Ferré S, Popoli P, Rimondini R, Reggio R, Kehr J, Fuxe K. Adenosine A2A and group I metabotropic glutamate receptors synergistically modulate the binding characteristics of dopamine D2 receptors in the rat striatum. *Neuropharmacology*. janeiro de 1999;38(1):129–40.

108. Chen JF, Beilstein M, Xu YH, Turner TJ, Moratalla R, Standaert DG, et al. Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A(2A) adenosine receptors. *Neuroscience*. 2000;97(1):195–204.
109. Alves CB, Almeida AS, Marques DM, Faé AHL, Machado ACL, Oliveira DL, et al. Caffeine and adenosine A2A receptors rescue neuronal development in vitro of frontal cortical neurons in a rat model of attention deficit and hyperactivity disorder. *Neuropharmacology*. abril de 2020;166:107782.
110. Biederman J, Mick E, Faraone S V, Braaten E, Doyle A, Spencer T, et al. Influence of gender on attention deficit hyperactivity disorder in children referred to a psychiatric clinic. *Am J Psychiatry*. janeiro de 2002;159(1):36–42.
111. Davies W. Sex differences in Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Candidate genetic and endocrine mechanisms. Vol. 35, *Frontiers in Neuroendocrinology*. Academic Press Inc.; 2014. p. 331–46.
112. Williams OOF, Coppolino M, George SR, Perreault ML. Sex differences in dopamine receptors and relevance to neuropsychiatric disorders. Vol. 11, *Brain Sciences*. MDPI; 2021.
113. Kalueff A. Measuring grooming in stress and comfort. Em: *Proceedings of Measuring Behaviour, 3rd International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research [Internet]*. Nijmegen, The Netherlands, The Netherlands: 3rd International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research; 2000. p. 148–9. Disponível em: <http://www.noldus.com/events/mb2000/program/abstracts/kalueff.html>
114. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:105–11.
115. Peters B, Kaiser J, Rahm B, Bledowski C. Object-based attention prioritizes working memory contents at a theta rhythm. *J Exp Psychol Gen*. junho de 2021;150(6):1250–6.
116. Chen JF. Adenosine receptor control of cognition in normal and disease. Em: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc.; 2014. p. 257–307.
117. Chasse R, Malyshev A, Fitch RH, Volgushev M. Altered heterosynaptic plasticity impairs visual discrimination learning in adenosine A1 receptor knock-out mice. *Journal of Neuroscience*. 26 de maio de 2021;41(21):4631–40.

7. ANEXO 1- COMPROVANTE DA CEUA



Universidade Paulista

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " ANÁLISE DA HIPERATIVIDADE E IMPULSIVIDADE DO CAMUNDONGO MUTANTE Km2d: UM NOVO MODELO DA SÍNDROME DE KABUKI ", protocolada sob o CEUA nº 6698260722 (ID 000869), sob a responsabilidade de **Maria Martha Bernardi e equipe; Rodrigo Augusto Silva; Alex de Camargo Coque** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 05/10/2022.

We certify that the proposal "Analysis of hyperactivity and impulsivity in the Km2d mutant mouse: a new model of Kabuki syndrome", utilizing 44 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 6698260722 (ID 000869), under the responsibility of **Maria Martha Bernardi and team; Rodrigo Augusto Silva; Alex de Camargo Coque** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 10/05/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 09/2022 a 09/2024 Área: Patologia Ambiental E Experimental

Origem: Biotério de Experimentação

Espécie: Camundongos isogênicos sexo: Machos e Fêmeas idade: 3 a 4 meses Quantidade: 44

Linhagem: BALB/c Peso: 30 a 35 g

São Paulo, 18 de abril de 2024

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

