

Natalli Granzotto

**EFEITOS FARMACOGENÉTICOS DO TRATAMENTO COM
CAFEÍNA EM RATOS ISOGÊNICOS SHR E SLA16**

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

Orientador: Prof. Dr.
Geison de Souza Izídio

Florianópolis
2016

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

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor
Maiores informações em:
<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Nome completo do autor

TÍTULO: SUBTÍTULO (SE HOUVER)

Este (a) Dissertação/Tese foi julgado(a) adequado(a) para obtenção do Título de “...”, e aprovad(o)a em sua forma final pelo Programa ...

Local, x de xxxxx de xxxx.

Prof. xxx, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Corientadora
Universidade xxxx

Prof. xxxx, Dr.
Universidade xxxxxx

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família por ter sido o porto seguro em toda a minha jornada em busca dos meus sonhos. Mesmo longe, o carinho de vocês sempre foi vital. Em especial à minha irmã Bárbara, uma parte tão importante de mim, que me dá as asas para voar e o equilíbrio para não cair. À minha mãe e meu padrasto, por sempre estarem dispostos à me ajudar, mesmo quando minhas escolhas contrariam às deles. À minha vó Maria, que sempre foi meu anjo da guarda e segurou minha mão nas horas boas e ruins. Às minhas pequenas Larissa e Júlia, de quem recebo o amor mais puro desse mundo.

Aos meus tios, tias, primas e minha vó Landa, por serem essa família incrível, cheia de amor e fé. Em especial também ao meu pai, sempre dizendo que tudo vai dar certo. À minha madrinha Ilda, que esteve ao meu lado desde que me entendo por gente, e junto com meu padrinho Joel me deu o privilégio de ser madrinha da ruivinha mais linda do mundo.

Ao meu namorado, Jerônimo, que tem sido o companheiro mais atencioso, carinhoso e paciente que eu poderia querer. Obrigada por ter me dado todo o amor que eu precisava, principalmente nas fases mais estressantes.

Um agradecimento muito especial ao meu orientador Geison. Por ter me guiado na construção do conhecimento da melhor maneira que eu consigo imaginar. Por ter feito todas as críticas e considerações de uma maneira tão atenciosa e gentil sempre. Mais que isso, por ter sido um ótimo amigo nos últimos anos. Obrigada pelas melhores conversas, científicas ou não. Minha admiração e carinho por ti só crescem.

Em seguida, gostaria de agradecer a todo o grupo do Laboratório de Genética do Comportamento, que têm sido minha família em Florianópolis desde 2010. Ao professor André que me deu a oportunidade de ingressar no mundo da ciência, um ótimo orientador e exemplo de ética e rigor científico. Ao pessoal das antigas, Elayne, John, Gustavo e Gabi, que foi minha inspiração na iniciação científica. À Mayara e à Fernanda, que foram muito mais que colegas, amigas queridas dentro e fora do laboratório. Ao pessoal mais recente Ana, Rafa, Jéssica e Guilherme, que animou meu dia várias vezes. Às amigas que me aproximei nos últimos tempos, Renata com o melhor abraço e Rachel, tão doce e tão brava quando necessário. À Pâmela, que foi a melhor amiga

que eu podia ter ao longo do mestrado, não tenho palavras pra agradecer todos os momentos que passamos nestes últimos dois anos.

Aos amigos que o mestrado me deu, em especial à Marina, por todos os cafés, chás, conversas e desabafos que me deram força nos momentos de desespero. À Claudini, com uma risada que sempre alegrava meu dia. À Marcelle, sempre tão certa e tão calma.

Aos meus amigos Leno, que tem um coração de ouro, Giovana e Lucas, sempre tão divertidos e acolhedores. Ao Meque, que foi mais que um amigo, cuidou de mim e dividiu comigo os melhores e piores momentos dos últimos anos. Obrigada pelas risadas, gordices e colos.

Obrigada ao meu amigo Ricardo, com quem tenho as discussões mais acaloradas sobre neurociência e suas múltiplas aplicações. Tu me ajudou mais do que pensa, cara!

Obrigada também à Julieta, que me aconchega e me conforta, mesmo sem dizer uma palavra.

Ao pessoal do Laboratório de Doenças Neurodegenerativas, em especial ao Prof. Dr. Rui Prediger, por compartilhar aparatos não disponíveis no nosso laboratório, muito importantes neste trabalho. À doutoranda Ângela, por todas as contribuições práticas e intelectuais, tanto nos experimentos quanto nas conversas rápidas de corredor.

A todos os colegas e professores do Departamento de Farmacologia. Em especial ao prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez, meu orientador de docência, que me fez enxergar o ensino e a construção do conhecimento com outros olhos.

À professora Dra. Regina H. Silva, à Dra. Cristiane R. Carvalho e, novamente, aos professores Dr. Rui D. Prediger e Antônio de Pádua Carobrez por terem aceitado avaliar este trabalho, contribuindo para o enriquecimento do mesmo.

Ao CNPq pelo suporte financeiro, essencial para a realização deste trabalho.

Um obrigada, também, a todos que não foram citados, mas contribuíram de alguma forma para que eu terminasse este projeto da melhor maneira que foi possível.

“If no mistake have you made, yet losing you are... a different game you
should play”
(Yoda)

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é o distúrbio psiquiátrico mais diagnosticado entre crianças e adolescentes, podendo persistir também durante a fase adulta. Atualmente, o modelo animal mais amplamente utilizado nos estudos pré-clínicos deste transtorno é a linhagem isogênica de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Apesar de muito valiosa, esta linhagem apresenta limitações, não sendo capaz de contemplar todas as questões levantadas na pesquisa do TDAH. Assim, no presente estudo, nós avaliamos a linhagem congênica SLA16, com a perspectiva que esta possa ser um modelo genético importante no estudo de endofenótipos do TDAH. No primeiro bloco experimental deste estudo, animais adultos de ambas as linhagens foram submetidos a testes comportamentais para avaliar sua emocionalidade, atividade locomotora, habituação e memória de trabalho e procedimento. Para isso, os animais foram expostos 5 dias consecutivos a: 5 minutos ou 1 hora de Campo Aberto (CA); 1 hora de Caixa de Atividades (CA_{ativ}); 4 tentativas diárias no Labirinto Aquático de Morris (LAM). No segundo bloco experimental partimos para uma abordagem farmacológica, para isso avaliamos os efeitos de um tratamento crônico com cafeína (CAF), durante a fase de adolescência dos animais, sobre atividade locomotora, emocionalidade e memória de trabalho e procedimento, ao fim do tratamento e um mês depois, quando os animais eram jovens adultos. A CAF é a droga psicoativa mais consumida no mundo, sendo consumida por diversas faixas etárias, incluindo crianças e adolescentes. Além disso, já foram relatados importantes efeitos da CAF sobre outros fenótipos relacionados ao TDAH, além do clássico aumento na atenção. Neste bloco, utilizamos novamente o CA (5 minutos, uma vez) e o LAM (4 tentativas diárias, 5 dias), testando os animais 3 dias, ou um mês após o fim do tratamento. O terceiro e último bloco de experimentos foi dedicado a avaliar se o tratamento crônico com CAF durante a adolescência afetaria a resposta a uma dose aguda da mesma na fase adulta. Para isso, testamos os animais, previamente expostos ao tratamento ou não, após uma dose aguda de CAF (10 mg/kg) no CA (5 minutos, uma vez). Os nossos resultados mostraram que os SLA16 exibem menores índices experimentais de emocionalidade, além de apresentarem uma hiperatividade locomotora em relação aos SHR no CA, nos

protocolos de 5 minutos. Ao longo dos 5 dias de protocolo, ambas as linhagens habituaram-se a CATiv, mas não ao CA. Os resultados do primeiro bloco também demonstraram que as memórias de trabalho e de procedimento de ambas as linhagens é equivalente. No segundo bloco experimental, o tratamento com CAF durante a adolescência pareceu diminuir a hiperatividade locomotora dos SLA16 ao fim do tratamento, e melhorar o desempenho dos SHR no protocolo de memória operacional, 30 dias após o fim tratamento. Estas evidências apontam para uma diferença farmacogenética na resposta à CAF, provavelmente devido à influência do *locus* diferencial localizado no cromossomo 4 destas duas linhagens. Os resultados do último bloco revelaram um aumento na sensibilidade à CAF da linhagem SLA16, mas não da SHR, quando previamente expostos ao tratamento crônico com a mesma. Estes dados são mais um indício de uma diferença farmacogenética entre as linhagens. Assim, concluímos que a linhagem SLA16 é equivalente à SHR quanto à memória operacional e habituação, e ainda mais hiperativa em situações de novidades ou desafio. O tratamento com CAF durante a adolescência dos animais melhorou certos endofenótipos relacionados ao TDAH, apesar de ter causado também uma sensibilidade aumentada. Por fim, o *locus* diferencial parece induzir importantes diferenças farmacogenéticas na resposta à CAF.

Palavras-chave: Endofenótipos de TDAH. Cafeína. Hiperatividade. Memória. SHR. SLA16.

ABSTRACT

Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD) is the most diagnosed psychiatric disorder among children and adolescents and may persist into adulthood. Currently, the animal model most widely used in preclinical studies of this disorder is the spontaneously hypertensive rats (SHR). Although very valuable, this strain has limitations, not being able to cover all the issues raised in ADHD research. In the present study, we evaluated the congenic strain SLA16, which might be an important genetic model in the study of endophenotypes of ADHD. In the first experimental unit of this study, adult rats of both strains were tested in behavioral paradigms to assess their emotionality, locomotor activity, habituation and working and procedure memory. For this, the animals were exposed 5 consecutive days: 5 minutes or 1 hour to Open Field (OF); 1 hour to Activities Box (AB); 4 daily trials in the Morris Water Maze (MWM). In the second experimental unit, we tried a pharmacologic approach, we evaluated the effect of chronic treatment with caffeine (CAF) during the adolescence stage on locomotor activity, emotionality and working and procedure memory, at the end of treatment and a month later, when the animals were young adults. CAF is the one psychoactive drug most consumed in the world, and it is consumed by all age's, including children and teenagers. Moreover, it has already been reported that CAF influences ADHD related phenotypes, besides the classic increase of attention. For this second unit, we used the OF again (5 min, once) and MWM (4 trials/day, 5 days), testing the animals 3 days or one month after the end of treatment. The third and last unit of experiments was devoted to evaluate whether chronic treatment with CAF during adolescence affect the response to an acute dose of CAF in adulthood. For this, we test the animals previously exposed to treatment or not, following an acute dose of CAF (10 mg / kg) at the OF (5 minutes, once). Our results showed that SLA16 exhibit lower levels of emotionality and presented a higher activity than SHR in OF, in 5 minutes protocols. During the 5-day protocol, both strains habituate to AB, but not to the CA. The first part of the results also showed that working memory is equivalent in both strains. In the second experimental unit, treatment during adolescence CAF appeared to decrease the locomotor hyperactivity of SLA16 at the end of the treatment and improved the procedure memory of SHR 30 days after the end of

treatment. This evidence suggests a pharmacogenetic difference in response to CAF, probably due to the influence of the differential locus on chromosome 4. The last block of the results revealed that chronic treatment with CAF led to an increased sensitivity on SLA16 strain, but not on SHR. These data are evidence of a pharmacogenetic difference between strains. Thus, we conclude that the SLA16 line is equivalent to SHR as the working and procedure memory and habituation, and even more hyperactive in novelty or challenging situations. The treatment with CAF during adolescence improved endophenotypes related to ADHD, although it also caused increased sensitivity. Finally, the differential locus seems to lead relevant pharmacogenetic differences in response to CAF.

Keywords: ADHD endophenotypes. Caffeine. Hyperactivity. Memory. SHR. SLA16.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

6-OHDA = 6-Hidroxidopamina

AD = Adenosina

ANOVA = Análise de Variância

Anxrr16 = *anxiety related response QTL 16* (QTL para respostas relacionadas à ansiedade 16)

CA = Campo Aberto

CAF = Cafeína

CAtiv = Caixa de Atividade

CEUA/UFSC = Comitê de tica no Uso de Animais em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina

COMT = Catecol-O-Metiltransferase

CPF = Córtex Pré-Frontal

DA = Dopamina

DAT = Transportador de Dopamina

DSM = Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EPM = Erro Padrão da Média

EST = Estriado

LAM = Labirinto Aquático de Morris

LEW = Lewis

MAO = Monoamina Oxidase

MFD = Metilfenidato

NAC = Núcleo *Accumbens*

QTL = *Locus* para Características Quantitativas

SAL = Salina 0,9%

SLA16 = SHR.Lewis/*Anxrr16*

SN = Substância Negra

SNC = Sistema Nervoso Central

SHR = Ratos Espontaneamente Hipertensos

TDAH = Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TH = Tirosina Hidroxilase

VMAT2 = Transportador Vesicular de Monoaminas 2

VTA = Área Tegmental Ventral

WKY = Wistar-Kyoto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias dopaminérgicas.....	28
Figura 2 – Esquema de uma sinapse dopaminérgica.....	30
Figura 3 – Modelos animais propostos para o estudo do TDAH.	34
Figura 4 – Os ratos SLA16 têm seu genoma praticamente idêntico aos SHR, com exceção do <i>locus</i> diferencial no cromossomo 4, proveniente da linhagem Lewis (LEW).....	39
Figura 5 – Campo Aberto.....	46
Figura 6 – Caixa de Atividade.....	47
Figura 7 – Labirinto Aquático de Morris.....	48
Figura 8 – Locomoção no Campo Aberto ao longo dos 5 dias de teste, durante 5 minutos/dia, de ratos SHR e SLA16.....	57
Figura 9 – Locomoção no Campo Aberto ao longo dos 5 dias de teste, durante 1 hora/dia, de ratos SHR e SLA16.....	59
Figura 10 – Locomoção total por dia, em números de cruzamentos dos lasers.....	60
Figura 11 – Locomoção a cada 5 minutos, ao longo dos 5 dias, em números de cruzamentos dos lasers.....	61
Figura 12 – Tempo de latência para encontrar a plataforma de SHR e SLA16.....	62
Figura 13. Tempo de latência para encontrar a plataforma de SHR e SLA16.....	62
Figura 14 – Locomoção Total no Campo Aberto dos grupos tratados com cafeína (2mg/kg) ou salina na adolescência.....	63

Figura 15 – Velocidade média no Campo Aberto dos grupos tratados com cafeína (2mg/kg) ou salina na adolescência.....	64
Figura 16 – Locomoção dos animais das linhagens SHR e SLA16, tratados com cafeína (2mg/kg) ou salina no Campo Aberto.....	65
Figura 17 – Tempo de latência para encontrar a plataforma no Labirinto Aquático de Morris, ao longo de 5 dias.....	66
Figura 18 – Tempo de latência para encontrar a plataforma no Labirinto Aquático de Morris, ao longo de 5 dias.....	67
Figura 19 – Locomoção no Campo Aberto dos animais das SHR e SLA16, tratados com cafeína (CAF – 10mg/kg) ou veículo (SAL).....	68
Figura 20. Tempo de latência para encontrar a plataforma no Labirinto Aquático de Morris, ao longo de 5 dias.....	68
Figura 21 – Locomoção dos animais SHR e SLA16, tratados com cafeína (CAF) ou veículo (SAL) no CA.....	70
Figura 22. Locomoção dos animais SHR e SLA16, tratados com cafeína (CAF) ou veículo (SAL) no CA.....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Experimentos desenvolvidos neste trabalho.....41

3.3.1.	Administração	Crônica	de	
Cafeína.....				48
3.3.2.	Administração	Aguda	de	
Cafeína.....				49
3.4.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....			49
3.4.1.	Primeiro		bloco	
experimental.....				49
3.4.2.	Segundo		bloco	
experimental.....				51
3.4.3.	Terceiro		bloco	
experimental.....				52
3.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA E REPRESENTAÇÃO DOS DADOS.....			55
4.	RESULTADOS.....			57
4.1.	PRIMEIRO		BLOCO	
EXPERIMENTAL.....				57
4.1.1.	Experimento 1	- Campo Aberto	repetido 5 minutos.....	57
4.1.2.	Experimento 2	- Campo Aberto	Repetido 1 hora.....	59
4.1.3.	Experimento 3	- Caixa de	Atividades.....	61
4.1.4.	Experimento 4	- Labirinto	Aquático de Morris.....	62
4.2.	SEGUNDO		BLOCO	
EXPERIMENTAL.....				64

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH)

Dentre as doenças psiquiátricas, o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é a mais prevalente entre crianças e adolescentes em idade escolar atingindo cerca de 5,3% a 7,1% dos indivíduos nesta faixa etária ao redor do mundo (POLANCZYK et al., 2007). Este distúrbio manifesta-se geralmente antes dos 7 anos e a prevalência e severidade dos sintomas frequentemente diminui conforme o passar da idade (HILL & SCHOENER, 1996; FARAONE & BIEDERMAN, 2005). A prevalência do TDAH também parece maior no gênero masculino que no feminino (KESSLER et al., 2006; WILLIAMSON & JOHNSTON, 2015).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM V – 2013) o TDAH é caracterizado por uma tríade básica de sintomas: hiperatividade, impulsividade e desatenção, que interferem no funcionamento ou no desenvolvimento do organismo. Contudo, ainda de acordo com o DSM V, existem três subtipos clássicos de apresentação clínica de TDAH: o predominantemente impulsivo/hiperativo, o predominantemente desatento e o quadro combinado.

Novamente de acordo com o DSM V:

A *desatenção* manifesta-se comportamentalmente no TDAH como divagação em tarefas, falta de persistência, dificuldade de manter o foco e

desorganização - e não constitui consequência de desafio ou falta de compreensão. A *hiperatividade* refere-se a atividade motora excessiva (como uma criança que corre por tudo) quando não apropriado ou remexer, batucar ou conversar em excesso. Nos adultos, a hiperatividade pode se manifestar como inquietude extrema ou esgotamento dos outros com sua atividade. A *impulsividade* refere-se a ações precipitadas que ocorrem no momento sem premeditação e com elevado potencial para dano à pessoa (p. ex., atravessar uma rua sem olhar). A impulsividade pode ser reflexo de um desejo de recompensas imediatas ou de incapacidade de postergar a gratificação. Comportamentos impulsivos podem se manifestar com intromissão social (p. ex., interromper os outros em excesso) e/ou tomada de decisões importantes sem considerações acerca das consequências no longo prazo (p. ex., assumir um emprego sem informações adequadas).

Recentemente passou-se a defender que o TDAH compreende um espectro, e não um caso unitário com alguns subtipos (HEIDBREder, 2015).

Apesar de a maioria dos autores relatarem o início antes dos 7 anos de idade, a transição entre infância e adolescência parece ser um momento determinante no desenvolvimento do TDAH (KIELING et al., 2010), pois a adolescência parece ser uma fase de alta vulnerabilidade a vários transtornos psiquiátricos (KESSLER et al., 2005) e também é a fase onde há maior prevalência de comportamentos de risco (STEINBERG, 2008). Assim, cerca de 50% dos pacientes diagnosticados com TDAH apresentam os primeiros sintomas antes dos 7 anos, 95% antes dos 12 anos e 99% antes dos 16 anos (KESSLER et al., 2005).

A hipótese mais aceita para explicar a neurobiologia do TDAH é a de que este é ocasionado por uma hipofunção dopaminérgica nas regiões corticais, límbicas e motoras do sistema nervoso central (SNC) (FARAONE & BIEDERMAN, 2005). Assim, as áreas cerebrais classicamente mais importantes, em se tratando do desenvolvimento dos sintomas, são o estriado (EST) e o córtex pré-frontal (CPF).

As vias dopaminérgicas estão demonstradas na figura 1. A maioria dos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos situam-se na área tegmental ventral (VTA) ou na substância negra (SN) e projetam-se para o EST ou para o CPF. Os neurônios que se projetam da VTA ao CPF formam a via mesocortical. Outra origem dos neurônios dopaminérgicos é o núcleo arqueado do hipotálamo, estes neurônios se projetam para a hipófise formando a via tuberoinfundibular, responsável principalmente pela regulação hormonal. Os neurônios que se projetam para uma parte específica do EST, o núcleo *accumbens* (NAc), e estendem-se ao CPF formam a via mesocorticolímbica.

A via mesocorticolímbica também é conhecida como o sistema de recompensa cerebral, e é responsável pelas respostas de prazer e reforço positivo, como as desencadeadas por alimentos, sexo e drogas de abuso (BRESSAN & CRIPPA, 2005; CARLEZON & THOMAS, 2009). Já a via mesocortical está implicada nas capacidades de planejamento, atenção, memória e flexibilidade comportamental (FLORESCO & MAGYAR, 2006). Neurônios dopaminérgicos originados na substância negra *pars compacta* (SNc) e que se projetam para o EST formam a via

nigroestriatal (Figura 1) que também tem importante papel no TDAH, uma vez que esta região tem forte influência sobre comportamentos relacionados à locomoção (ROMANOS et al., 2010).

Outras regiões cerebrais que também parecem importantes na fisiopatologia do TDAH são o córtex parietal e o córtex temporal, que podem ser controlados por projeções vindas do CPF (RHODES & KILLCROSS, 2004; CASEY et al., 2007).

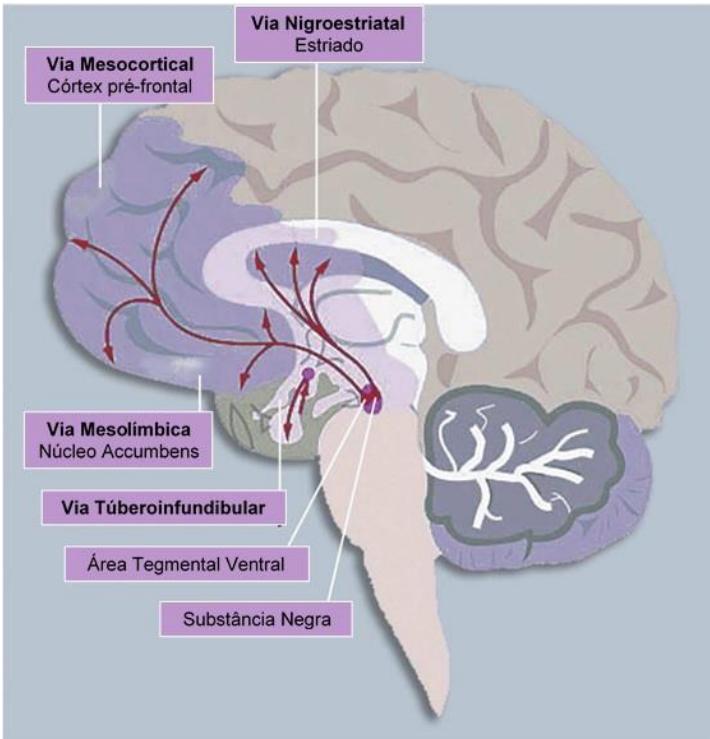


Figura 1. Vias dopaminérgicas. Adaptado de Ernst & Luciana, 2015; com ferramentas do pacote Office do Windows 8.1© 2013 Microsoft Corporation.

A figura 2 mostra, de maneira esquemática, uma sinapse dopaminérgica. A dopamina (DA) é sintetizada principalmente a partir da fenilalanina adquirida pela dieta, por uma série de processos enzimáticos dos quais uma etapa limitante é a enzima tirosina hidroxilase (TH). Também merecem destaque os transportadores: VMAT2 (transportador vesicular de monoaminas) – responsável armazenamento de DA nas vesículas; e DAT (transportador de dopamina) – responsável pela recaptação de DA pelo terminal pré-sináptico. O metabolismo de DA é realizado por duas enzimas principais: a MAO (monoamina oxidase) e a COMT (catecol-O-metiltransferase).

Estas enzimas (TH, MAO e COMT) e transportadores (VMAT e DAT), juntamente com os receptores dopaminérgicos, são os principais pontos de modulação do sistema dopaminérgico e classicamente alvos das intervenções farmacológicas.

São descritos 5 receptores dopaminérgicos, divididos em duas famílias. A família D1 é composta pelos receptores D1 e D5, receptores metabotrópicos acoplados a uma proteína G estimulatória. Já a família D2 é composta por receptores do tipo D2, D3 e D4, receptores metabotrópicos ligados às proteínas G inibitórias.

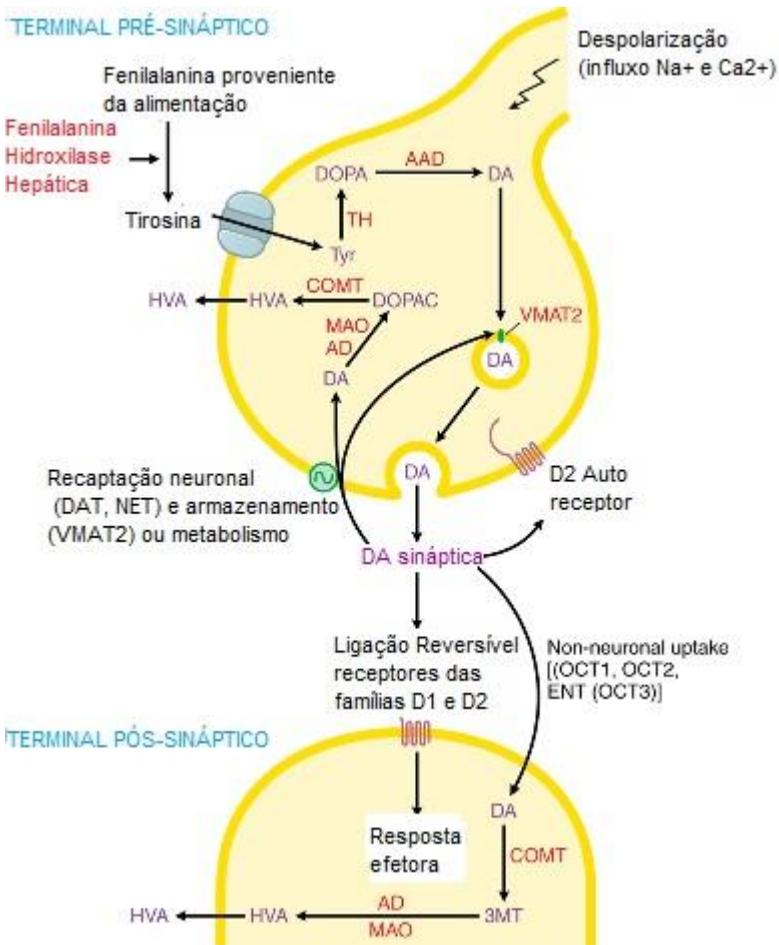


Figura 2. Esquema de uma sinapse dopaminérgica. São ilustradas as vias de síntese, armazenamento, liberação, recaptação e metabolismo. DA = dopamina, TH = tiosina hidroxilase, Tyr = tiosina, VMAT2 = transportador vesicular de monoaminas 2, HVA = ácido homovalínico, AAD = L-aminoácido aromático descarboxilase, COMT = catecol-O-metil transferase, MAO = monoamina oxidase, DOPAC = ácido diidrofenilacético, DAT = transportador de dopamina, NET = transportador de norepinefrina, Adaptado de Goodman e Gilman 12ª edição; com ferramentas do pacote Office do Windows 8.1© 2013 Microsoft Corporation.

1.2 INTERAÇÃO ADENOSINA-DOPAMINA

O sistema purinérgico, especialmente o adenosinérgico, é conhecido por modular vários sistemas de neurotransmissores (colinérgico, noradrenérgico, histaminérgico, orexinérgico, entre outros). Dentre eles, acredita-se que o sistema adenosinérgico possa também modular o sistema dopaminérgico (KRÜGEL et al., 2001), pois várias evidências desta interação são encontradas na literatura (BALLARIN et al., 1995; FERRÉ et al., 1997; KRÜGEL et al., 2001; 2003; FERRÉ et al., 2004; MALAVE & BRODERICK, 2014; VOLKOW et al., 2015).

Os receptores de adenosina (AD) descritos até hoje são A1, A2A, A2B e A3, todos ligados à proteína G. Os receptores A1 e A3 são do tipo inibitório, uma vez que inibem a produção do AMPc (adenosina monofostato cíclico); um importante segundo mensageiro. Já os receptores A2A e A2B têm um caráter estimulatório, pois, de maneira geral, ativam a adenilato ciclase aumentando o AMPc. A AD tem alta afinidade pelos receptores A2A e A1, afinidade intermediária pelos receptores A3, e baixa afinidade pelos receptores A2B (JACOBSON & GAO, 2006).

Os mecanismos pelos quais o sistema adenosinérgico modula o dopaminérgico ainda não estão bem elucidados, mas uma vertente atual de pesquisadores defende que a formação de oligômeros de receptores de adenosina e dopamina parece ser bastante importante (CIRUELA et al., 2011). Zoli e colaboradores propuseram, em 1993, que receptores A2A estariam acoplados a receptores D2 na membrana neuronal, e esta seria uma

importante via de modulação sistema-sistema. Mais tarde essa heteromerização foi confirmada (HETTINGER et al., 2001; FUXE et al., 2005), além de ter se expandido para dímeros A1-D1 (GINÉS et al., 2000) e mais recentemente heterotetrâmeros A2A-D2 (BONAVENTURA et al., 2015). Sabe-se, também, que os receptores do tipo A2A localizados nos EST e na SN são capazes de modular a atividade da TH (ONALI et al., 1988) e a síntese de dopamina (CHOWDHURY & FILLENZ, 1991).

Atualmente uma visão mais integrada entre os sistemas de neurotransmissores tem ganhado força e a modulação indireta do sistema dopaminérgico (por exemplo, pela via adenosinérgica) como alternativa terapêutica parece cada vez mais plausível (JACOBSON & GAO, 2006).

1.3 MODELOS ANIMAIS DE TDAH

Para investigar a neurobiologia dos transtornos psiquiátricos, bem como avaliar os efeitos das terapias disponíveis e desenvolver novas alternativas terapêuticas, faz-se necessário o uso de alguns modelos animais não-humanos. Estes modelos são de extrema importância, uma vez que permitem condições padronizadas e controladas de experimentação, ao contrário dos seres humanos. Roedores em especial têm sido amplamente utilizados na pesquisa biomédica, uma vez que são pequenos, de fácil manipulação e reprodução e não demandam grandes instalações, comparados com outros modelos animais (JACOB, 2010). Além disso, roedores têm uma grande similaridade

genética, fisiológica e anatômica com os seres humanos, o que reforça seu valor na pesquisa biomédica (JACOB, 2010; BRYDA, 2013). Outro ponto importante é a possibilidade de manipulação genética em roedores, que vem trazendo grandes contribuições para os estudos dos distúrbios psiquiátricos humanos (DONALDSON & HEN, 2015).

Neste momento, cabe a ressalva que todos os modelos têm suas limitações, uma vez que os transtornos psiquiátricos humanos envolvem fatores bastante subjetivos. Assim não podemos confirmar que um roedor apresente ou não TDAH, mas sim podemos inferir nele comportamentos relacionados ao transtorno humano. Desta maneira, os modelos disponíveis hoje são bastante úteis nas abordagens a que se determinam, e quando analisados em conjunto dão um suporte mais sólido para a compreensão do TDAH.

Existem vários critérios para um modelo animal ser válido para o estudo do TDAH (DAVIDS et al., 2003; SAGVOLDEN et al., 2005). Os critérios de validação de face (ou de analogia) envolvem os endofenótipos de impulsividade motora, prejuízos nas tarefas que exigem atenção sustentada e hiperatividade. A validação de construto (ou de homologia) envolve predisposições genéticas, disfunções neuroestruturais e funcionais compatíveis com o TDAH, disfunções nas vias dopaminérgicas e em outras vias monoaminérgicas e a resposta a psicoestimulantes. Finalmente, a validação preditiva diz respeito à resposta do modelo aos fármacos usados na clínica para tratamento do TDAH (SAGVOLDEN et al., 2005).

A literatura traz inúmeros modelos animais para estudo do TDAH, cada um com suas particularidades, dentre eles estão os modelos de variantes genéticas (como os camundongos *knock out* para o DAT, por exemplo), modelos de exposição às neurotoxinas ou irradiação hipocampal, entre outros (DAVIDS et al., 2003; SAGVOLDEN et al., 2005). A figura 3 resume os principais modelos de roedores utilizados no estudo do TDAH.

MODELO ANIMAL	ANALOGIA			HOMOLOGIA		PREDITIVO
	Hiperatividade	Desatenção	Impulsividade	DAT	D4	Metilfenidato
Lesão neonatal com 6-OHDA	Sim	Sim	-	-	Sim	Sim
Modelo da hipóxia neonatal	Sim	-	-	Não	-	-
Modelo BrdU-neonatal	Sim	-	-	-	-	Não
Stunting cerebelar	Sim	-	-	-	-	Não
Irradiação cerebelar	Sim	Sim	-	-	-	-
SHR	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Ratos WKHA	Sim	Sim	Sim	-	-	Não
Ratos NHE	Sim	Sim	-	Sim	-	-
Camundongos running	Sim	-	-	-	-	Sim
Camundongos coloboma	Sim	-	-	-	-	Não
Camundongos acallosal	Sim	Sim	-	-	-	-
Camundongos DAT KO	Sim	-	Sim	Sim	-	Sim
Camundongos DAT KD	Sim	-	Sim	Sim	-	-
Mutações na tireóide	Sim	Sim	Sim	-	-	Não
Rato hipossexual	Sim	Sim	-	-	-	-

Figura 3. Modelos animais propostos para o estudo do TDAH. Adaptado de Pandolfo, 2010, com ferramentas do pacote Office do Windows 8.1© 2013 Microsoft Corporation.

Estes modelos têm abordagens diversas, mas todos buscam reproduzir endofenótipos (traços observáveis) do TDAH (DAVIDS et al., 2003; SAGVOLDEN et al., 2005).

1.4. A LINHAGEM SHR

Um dos modelos genéticos mais amplamente utilizados nos estudos do TDAH são os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (SAGVOLDEN, 2000). Eles foram selecionados, pelos

pesquisadores japoneses Okamoto e Aoki (1963), a partir de animais da linhagem Wistar que espontaneamente tinham pressão sanguínea alta, e foram cruzados por sucessivas gerações. Esta seleção artificial culminou com uma linhagem isogênica de ratos, que desenvolvem hipertensão arterial sistêmica de forma espontânea (BEIERWALTES, ARENDSHORST & KLEMER, 1982).

Assim como a teoria dopaminérgica postula para o desenvolvimento do TDAH em humanos, os SHR também exibem uma hipofunção dopaminérgica (RUSSELL et al., 1998). Além disso, eles apresentam atenção sustentada deficiente, impulsividade motora e hiperatividade nas câmaras de condicionamento operante, compatíveis com os comportamentos exibidos por pacientes com TDAH (SAGVOLDEN et al., 2000; 2005).

A literatura conta com diversas evidências de distúrbios no sistema dopaminérgico dos SHR. Por exemplo, o armazenamento vesicular de DA nos animais SHR parece estar prejudicado no córtex pré-frontal (CPF), núcleo *accumbens* (NAc) e Caudado/Putamen (RUSSEL et al., 1998). Já os receptores D2 e DAT parecem ter expressão aumentada (RUSSEL et al., 1998; 2000), resultando em uma diminuição dos níveis extracelulares de DA nestes animais (SAGVOLDEN, 2005). Além disso, já foi relatado que o principal metabólito de DA, DOPAC está aumentado no hipocampo dos SHR, em relação aos LEW (CHIAVEGATTO et al., 2009). Outro ponto que reforça a teoria de hipofunção dopaminérgica nos SHR é a expressão aumentada de

receptores D1 e D5 no EST, NAc e tubérculo olfatório (CAREY, et al. 1998).

Também já foram descritas variações no gene DAT-1 dos SHR, quando comparado com seu controle genético Wistar Kyoto (WKY). Igualmente já foi descrita uma expressão reduzida e transitória para o gene do DAT no mesencéfalo dos SHR no primeiro mês pós-natal (LEO et al., 2003), mas que parece estar aumentada nos adultos (WATANABE et al., 1997).

Além da hipofunção dopaminérgica, os SHR parecem ter também uma hiperativação adrenérgica (RUSSELL, 2002), prejuízos no influxo de cálcio (LEHOHLA; KELLAWAY & RUSSELL, 2004) e diminuição nos níveis de AMPc (MARCIL et al., 1997).

Em relação à validade preditiva, algumas evidências mostram que os SHR parecem ter uma melhora da hiperatividade e da atenção frente à intervenção farmacológica com metilfenidato (MFD) e anfetamina (MYERS, MUSTY & HENDLEY, 1982; SAGVOLDEN et al., 1992). Contudo, dados de um estudo conduzido por Vendruscolo e colaboradores (2008) sugerem que o tratamento com MFD durante a adolescência dos SHR está correlacionado a um aumento nos índices experimentais de ansiedade na fase adulta. Além disso, este mesmo estudo mostra que houve um aumento no consumo de etanol pelas fêmeas SHR adultas que tinham sido tratadas com MFD durante a adolescência.

Outro ponto que parece reforçar as semelhanças dos SHR com as crianças com TDAH é a diferença entre os gêneros (SAGVOLDEN et al., 2005). Tanto machos, quanto fêmeas, SHR

parecem ser hiperativos e ter problemas de discriminação. Mas as fêmeas parecem ter um perfil predominantemente desatento e os machos predominantemente impulsivo/hiperativos (BERGER & SAGVOLDEN, 1998), assim como ocorre em humanos.

Contudo, como qualquer outro modelo animal, os ratos SHR possuem algumas limitações no seu uso dentro da pesquisa do TDAH. Talvez, a principal destas limitações seja a sua hipertensão arterial sistêmica espontânea (DAVIDS et al., 2003; SAGVOLDEN et al., 2005), pois esta comorbidade nem sempre se faz presente em seres humanos. Além disso, os fármacos psicoestimulantes usados no tratamento do TDAH podem afetar o funcionamento cardiovascular (WINTERSTEIN et al., 2009), o que complicaria o uso dos ratos SHR neste estudo.

Por fim, algumas evidências na literatura mostram que o tratamento crônico com MFD não atenua, e sim até exacerba os traços de hiperatividade, impulsividade e déficit cognitivo/mnemônico nos ratos SHR (BIZOT et al., 2007; THANOS et al., 2010; DELA PEÑA et al., 2014).

Assim, se fazem necessários estudos que busquem a validação de outros modelos genéticos, que possam nos ajudar no avanço da compreensão da neurobiologia do TDAH e de tratamentos mais eficazes para este transtorno humano.

1.5. A LINHAGEM SLA16

A linhagem congênica SLA16 (SHR.Lewis/Anxrr16) foi desenvolvida no Laboratório de Genética do Comportamento – LGC, para investigar a influência do *locus Anxrr16* (do inglês *Anxiety related response*) sobre comportamentos relacionados à emocionalidade, principalmente comportamentos “tipo ansioso”. Este *locus* foi identificado por Ramos e colaboradores em 1999, em sua busca por *loci* que influenciassem características quantitativas, também chamada de análise de QTL (*quantitative trait locus*). O *Anxrr16* parece influenciar principalmente a locomoção no centro do CA, um parâmetro clássico de emocionalidade em roedores (RAMOS et al., 1999; MORMÉDE et al., 2002).

A construção da linhagem SLA16 foi descrita detalhadamente por De Medeiros e colaboradores em 2013, mas de maneira sucinta - a linhagem foi desenvolvida por sucessivos retrocruzamentos entre as linhagens SHR (receptora) e Lewis (doadora) - culminando em uma linhagem com um genoma inteiro da linhagem SHR, com exceto pelo *locus* de interesse proveniente da linhagem Lewis (Figura 4).

O comportamento dos SLA16 parece diferir dos SHR principalmente quanto a parâmetros locomotores quando há um fator novidade (DE MEDEIROS et al., 2013; ANSELMINI et al., 2016). As concentrações de DAT e de receptores D2 no hipocampo dos SLA16 parecem ser similares as dos SHR (CORVINO, 2015), sugerindo que a linhagem SLA16 também

apresenta hipofunção dopaminérgica, uma importante característica do TDAH. Além disso, os ratos SLA16 parecem apresentar menor pressão arterial do que os SHR (CORRÊA, 2015). Juntas estas características podem ser vantajosas no estudo de alguns aspectos do TDAH, principalmente nos pontos em que ocorrem limitações naturais da linhagem SHR. Ou seja, nossa primeira hipótese experimental, neste estudo, é a de que a linhagem SLA16 seria um modelo genético ainda melhor, que a SHR, em alguns aspectos, para o estudo do TDAH.

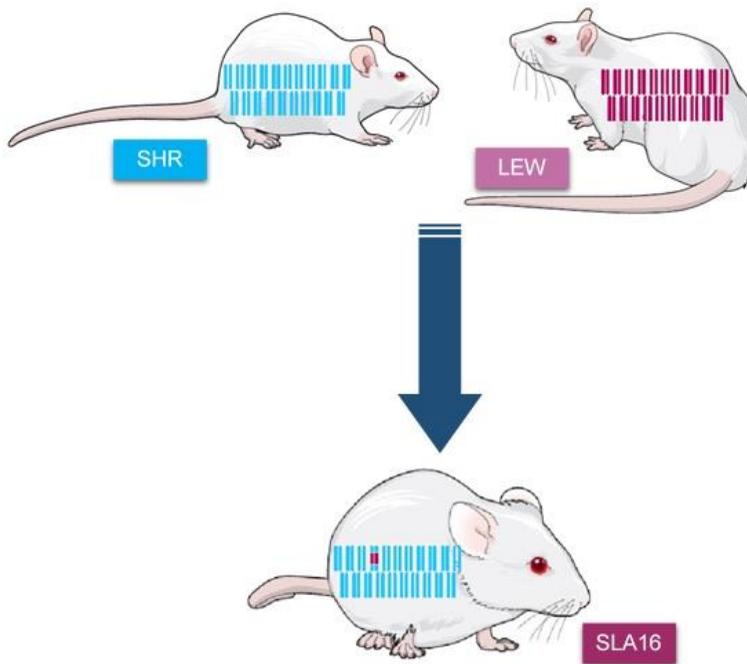


Figura 4. Os ratos SLA16 têm seu genoma praticamente idêntico aos SHR, com exceção do *locus* diferencial no cromossomo 4, proveniente da linhagem Lewis (LEW). Figura elaborada com base no site <www.mindthegraph.com> e ferramentas do paint e do office do Windows 8.1© 2013 Microsoft Corporation.

1.6. TRATAMENTO DO TDAH

O primeiro medicamento de escolha para tratar o TDAH atualmente é o MFD, um bloqueador do DAT. De maneira aguda o MFD tem efeitos psicoestimulantes, mas o efeito crônico do tratamento efetivamente melhora os sintomas por uma modulação um tanto quanto paradoxal do sistema. Da mesma forma, a anfetamina também leva a uma melhora dos sintomas, quando do uso crônico (SEEMAN & MADRAS, 1998). Entretanto, a administração repetida de drogas psicoestimulantes, com potencial de abuso, pode levar a uma gama de efeitos adversos que incluem paranoia, sensibilização e dependência (FLETCHER, KORTH & CHAMBERS, 1999; KUCZENSKI & SEGAL, 2001; DALLEY et al., 2005)

Uma revisão sistemática (meta-análise), do ano de 2015, analisou 38 ensaios clínicos em paralelo (5.111 pacientes) e 147 estudos do tipo *crossover* (7.134 pacientes) com pacientes diagnosticados com TDAH. Eles tinham idade entre 3 e 21 anos, eram de ambos os sexos (5 meninos para cada menina), e foram tratados com MFD ou placebo. A conclusão dos autores foi que existe uma melhora dos sintomas associada ao uso de MFD. Porém, estudos clínicos mais bem delineados deverão corroborar este ponto futuramente (STOREBO et al., 2015).

O tratamento com MFD durante a adolescência parece não normalizar a expressão de D2 (aumentada nos SHR, em relação a seu controle WKY) (RUSSEL et al., 2000). Além disso, estudos mostram que o tratamento crônico com MFD pode levar à

sensibilização cruzada com cocaína (TORRES-REVERÓN & DOW-EDWARDS, 2005) e com anfetamina (VALVASSORI et al., 2007).

Na busca de tratamentos para o TDAH, alternativos ao uso do MFD e anfetaminas, uma grande aposta tem sido a cafeína (CAF). A CAF é um antagonista adenosinérgico, com alta afinidade pelos receptores A2A e A1 (FISONE et al., 2004). A CAF também gera um bloqueio dos receptores A2A e A1 nos gânglios basais, estruturas envolvidas com o controle motor (FISONE et al., 2004), um ponto bastante importante na sintomatologia do TDAH.

A CAF também interage com outros sistemas, como o gabaérgico, modula a atividade da enzima fosfodiesterase e mobilização de cálcio, porém estes mecanismos parecem ter importância apenas em doses tóxicas (FREEDHOLM et al., 1999).

Em 1973, Schnackenberg propôs que a cafeína seria uma boa alternativa terapêutica no tratamento do TDAH, uma vez que seus dados mostraram uma melhora dos sintomas em 11 crianças hiperativas que apresentavam efeitos adversos quando do uso do MFD. A partir daí, inúmeros estudos se seguiram na tentativa de elucidar a relação entre CAF e TDAH (IONNIDINIS, CHAMBERLAIN & MÜLLER, 2014).

Por exemplo, crianças diagnosticadas com TDAH parecem ter um perfil hipoexcitável (*hypoarousal*), que melhora com a administração oral de cápsulas cafeína (BARRY et al., 2012). Além disso, o tratamento crônico com cafeína durante a adolescência, de ratos com lesão neonatal por 6-OHDA (6-hidroxidopamina), parece gerar uma melhora no prejuízo

atencional deste modelo de TDAH (CABALLERO et al., 2011). Contudo, até o momento são poucos os estudos que exploram o tratamento crônico com CAF em modelos animais durante a fase de infância e adolescência.

Assim, nossa segunda hipótese experimental é a de que o tratamento crônico com cafeína pode melhorar aspectos comportamentais relacionados ao TDAH, nos ratos SLA16 e SHR.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as linhagens SLA16 e SHR quanto a endofenótipos relacionados ao TDAH e frente ao tratamento com cafeína.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar o perfil comportamental dos animais das linhagens SLA16 e SHR, quando repetidamente expostos a testes de emocionalidade, atividade locomotora e memória operacional (primeiro bloco experimental).
- Analisar a emocionalidade, atividade locomotora e memória operacional dos animais das linhagens SLA16 e SHR, a um tratamento crônico com cafeína, durante a adolescência (segundo bloco experimental).
- Investigar se o tratamento crônico com cafeína, durante a adolescência, influencia a resposta a uma dose aguda de cafeína, na fase adulta, dos animais das linhagens SLA16 e SHR (terceiro bloco experimental).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Ratos machos das linhagens SLA16 e SHR foram criados no biotério do Laboratório de Genética do Comportamento, alojados de 5 a 6 animais por gaiola, com temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclos claro/escuro de 12 em 12h (luzes ligadas das 7:00 às 19:00h). Os animais tiveram acesso à água e comida *ad libitum*. Os números amostrais e idades dos animais são descritos a cada protocolo. Todos os procedimentos foram executados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina – CEUA/UFSC, aprovados sob o protocolo PP00903.

3.2. TESTES COMPORTAMENTAIS

3.2.1 Campo Aberto (CA)

O campo aberto (CA) foi proposto por Calvin Hall em 1934. Desde então, ele tem sido amplamente utilizado como um teste clássico para avaliar traços de emocionalidade e/ou locomoção em roedores. O aparato onde foi realizado consiste em uma arena medindo 1 m² e com paredes de 40 cm de altura (Fig. 5). A área dos 90 cm² centrais é considerada a região central, enquanto a área restante, contígua às paredes é considerada a área periférica. Os testes foram realizados sob iluminação de 10 lux.

Os parâmetros avaliados foram: tempo no centro, locomoção total, porcentagem de locomoção central, latência para primeira saída do centro e velocidade média.



Figura 5. Campo Aberto. Adaptado de De Medeiros, 2012.

3.2.2. Caixa de Atividade (CA_{ativ})

Com a finalidade de avaliar a atividade locomotora dos animais utilizamos a CA_{ativ}. O aparato consistia em uma caixa de madeira, medindo 70x27 cm, com paredes de 22 cm de altura, fechadas com uma tampa acrílica transparente, e fundo formado de uma grade metálica (Fig. 6). Ao longo da caixa são distribuídos três sensores infravermelhos, e o número de interrupções é mostrado imediatamente em um *display* digital do dispositivo contador acoplado a caixa. A luminosidade dentro da caixa durante os testes foi de 7 lux.

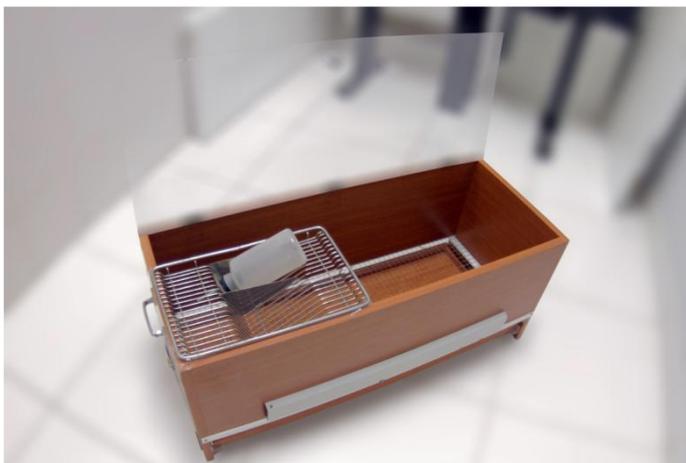


Figura 6. Caixa de Atividades. Retirado de De Medeiros, 2012.

3.2.3. Labirinto Aquático de Morris (LAM)

O Labirinto Aquático de Morris (LAM) foi proposto por Morris e colaboradores em 1982, como um teste para avaliar parâmetros de memória dos animais. O aparato utilizado foi um

tanque circular com 1,7m de diâmetro e 80 cm de altura, situado em uma sala com pistas visuais nas paredes. O tanque foi preenchido com água a aproximadamente 25° C até 60 cm. O labirinto foi dividido em quatro quadrantes: Sudeste, Sudoeste, Nordeste e Noroeste (Fig. 7). Foi utilizada uma plataforma quadrada de acrílico transparente, medindo 10 x 10 cm, que ficava submersa, 1 cm abaixo do nível da água.

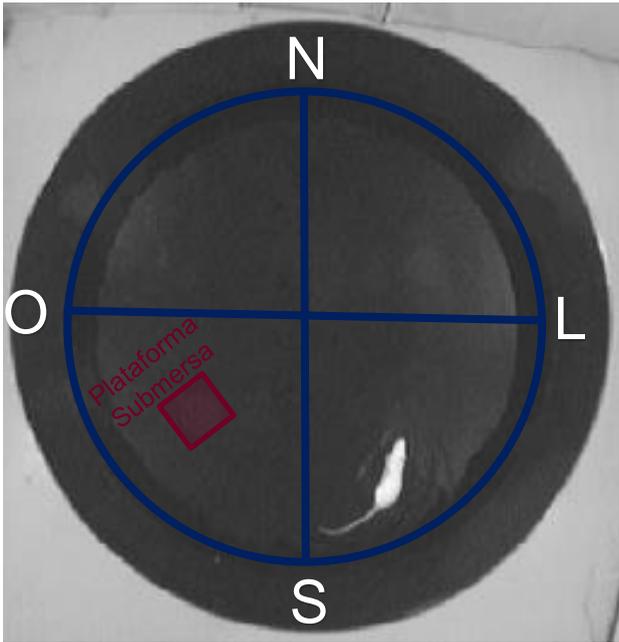


Figura 7. Labirinto Aquático de Morris. Adaptado de <<http://www.watermaze.org/>> com ferramentas do pacote Office do Windows 8.1© 2013 Microsoft Corporation.

3.3. ADMINISTRAÇÃO DE CAFEÍNA

3.3.1. Administração Crônica de Cafeína

A cafeína (Sigma) foi diluída em salina 0,9%. Os animais testados no segundo bloco experimental, e no experimento 10 (descritos a seguir) receberam a dose de 2 mg/kg de cafeína, ou solução salina (controle). As administrações foram de 12 em 12 horas via IP, durante 21 dias - entre os dias 24 e 45 de idade. O volume injetado foi de 2 ml/kg.

3.3.2. Administração Aguda de Cafeína

A cafeína (Sigma) foi diluída em salina 0,9%. Os animais testados no terceiro bloco experimental (descrito a seguir) receberam 10 mg/kg de CAF, ou salina (controle), no volume de 2 ml/kg, via IP. As injeções foram administradas 20 minutos antes do teste comportamental.

3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho constam 10 experimentos comportamentais divididos em 3 blocos experimentais, que foram planejados para responder os três objetivos específicos (Item 2.2). Cada um dos experimentos comportamentais está descrito a seguir e resumidos no Quadro 1.

3.4.1. Primeiro bloco experimental

No primeiro bloco experimental os animais com 10 semanas de idade foram expostos repetidamente aos testes do CA, CATiv, e LAM.

Dentro deste primeiro bloco experimental, nós realizamos 4 experimentos diferentes (experimentos 1 a 4). Nos **experimentos 1 e 2** foi avaliado o perfil comportamental das linhagens SLA16 e SHR quando repetidamente expostos ao CA. Ele consistiu em 5 dias consecutivos de teste neste aparato. Cada animal foi liberado no centro do aparato e seu comportamento foi analisado durante 5 minutos (experimento 1) ou uma hora (experimento 2). Foram utilizados 10 animais de cada linhagem, com 10 semanas de idade em cada experimento.

No **experimento 3** foi avaliado o perfil comportamental das linhagens SLA16 e SHR quando repetidamente expostos à CATiv. Cada animal foi colocado individualmente na CATiv, onde permaneceu durante uma hora. Este procedimento foi repetido ao longo de 5 dias consecutivos. A atividade locomotora dos animais foi avaliada conforme o número de interrupções dos feixes infravermelhos. Foram testados 10 animais de cada linhagem, com 11 semanas de idade.

No **experimento 4** foi avaliado o perfil comportamental das linhagens SLA16 e SHR quando expostos a um teste de memória operacional. O teste do LAM consistiu em 4 sessões de treinos diárias, durante 5 dias consecutivos. A plataforma foi fixada em um dos quadrantes antes dos treinos e permaneceu no mesmo

durante todo o dia, sendo realocada em outro quadrante pseudoaleatório no dia subsequente.

Os animais foram liberados de pontos diferentes, escolhidos de maneira pseudorrandômica também, em cada sessão de treino. Em cada tentativa os animais nadaram até encontrar a plataforma ou até atingir o tempo de 60 segundos, quando eram conduzidos gentilmente até a plataforma pelo experimentador. Após alcançar a plataforma, o animal permanecia na mesma durante 30 segundos.

Foram testados 8 animais *naïve* de cada linhagem, com 11 semanas para uma avaliação do perfil de memória de trabalho e de procedimento. O principal parâmetro analisado foi a latência para encontrar a plataforma.

3.4.2. Segundo bloco experimental

No segundo bloco experimental os animais foram expostos aos testes do CA e LAM 3 dias após o fim do tratamento crônico com cafeína na 6ª semana de idade, ou 30 dias após o fim do tratamento, com 11 semanas de idade. Este bloco de experimentos foi conduzido com animais tratados conforme descrito no item 3.3.1. Dentro deste bloco experimental, nós realizamos 4 experimentos diferentes (experimentos 5 a 8).

Os **experimentos 5 e 6** utilizaram o CA, como descrito anteriormente, e analisaram a resposta dos animais das linhagens SLA16 e SHR, ao tratamento crônico, com cafeína, durante a adolescência.

No **experimento 5**, os animais foram testados 3 dias após o fim do tratamento crônico. Foram testados 8 animais por grupo de 48 dias de idade, totalizando 32 animais. O **experimento 6** foi realizado de maneira idêntica ao anterior, porém, os animais foram testados 30 dias após o fim do tratamento crônico. Foram testados 8 animais por grupo de 76 dias de idade, totalizando 32 animais.

Os **experimentos 7 e 8** utilizaram o LAM, como descrito anteriormente, e avaliaram possíveis influências do tratamento crônico (descrito no item 3.3.1) com CAF durante a adolescência na memória de trabalho e procedimento dos animais.

O **experimento 7** testou os animais após o fim do tratamento crônico. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, 4 tentativas diárias em 5 dias consecutivos. Foram testados 8 animais por grupo de 6 semanas de idade, totalizando 32 animais. O **experimento 8** utilizou o mesmo procedimento do anterior, mas neste, os animais foram testados no LAM 30 dias após o fim do tratamento. Foram testados 8 animais por grupo de 76 dias de idade, totalizando 32 animais.

3.4.3. Terceiro bloco experimental

O terceiro e último bloco experimental teve como objetivo investigar possíveis mudanças comportamentais na resposta a uma dose aguda de cafeína em animais de 11 semanas de idade, após tratamento crônico, durante a adolescência. Para isso os animais de 11 semanas, com ou sem tratamento prévio com cafeína, receberam administração aguda de cafeína e foram

testados no CA. Dentro deste bloco experimental, nós realizamos 2 experimentos diferentes (experimentos 9 a 10).

O **experimento 9** utilizou novamente o CA, descrito anteriormente, para avaliar o efeito da administração aguda de CAF. O protocolo utilizado foi similar ao dos experimentos 5 e 6, onde o animal era liberado no centro do aparato, 20 minutos após a injeção de CAF (conforme descrito no item 3.3.2), e podia explorá-lo livremente por 5 minutos. Foram testados 6 animais por grupo, 24 no total, com 11 semanas de idade.

O **experimento 10** utilizou o mesmo protocolo do experimento 9, mas aqui os animais usados receberam o tratamento crônico com CAF durante a adolescência, de maneira idêntica a utilizada no segundo bloco experimental (item 3.3.1). Um mês após o fim das injeções, quando os animais tinham 11 semanas de idade (8 animais/linhagem/tratamento), foram submetidos a injeção aguda de CAF e, 20 minutos depois, alocados no centro do CA, para explorá-lo livremente por 5 minutos.

O quadro 1 sumariza os experimentos realizados neste trabalho e detalha os aparatos, tratamentos e protocolos utilizados em cada um deles.

Quadro 1. Resumo dos 10 experimentos desenvolvidos neste trabalho.

	Experimento	Aparato	Tratamento	Protocolo
1º Bloco Experimental	Experimento 1	Campo Aberto	-	5 minutos, 5 dias consecutivos
	Experimento 2	Campo Aberto	-	1 hora, 5 dias consecutivos
	Experimento 3	Caixa de Atividade	-	1 hora, 5 dias consecutivos
	Experimento 4	Labirinto Aquático de Morris	-	4 tentativas/dia, 5 dias consecutivos
2º Bloco Experimental	Experimento 5	Campo Aberto	Crônico (21d) CAF 2mg/kg ou SAL	Ao fim do tratamento, 5 minutos
	Experimento 6	Campo Aberto	Crônico (21d) CAF 2mg/kg ou SAL	30 dias após o fim do tratamento, 5 minutos
	Experimento 7	Labirinto Aquático de Morris	Crônico (21d) CAF 2mg/kg ou SAL	Ao fim do tratamento, 5 dias, 4 tentativas/dia
	Experimento 8	Labirinto Aquático de Morris	Crônico (21d) CAF 2mg/kg ou SAL	30 dias após o fim do tratamento, 5 dias, 4 tentativas/dia
3º Bloco Experimental	Experimento 9	Campo Aberto	Agudo CAF 10 mg/kg ou SAL	5 minutos
	Experimento 10	Campo Aberto	Desafio de CAF 10mg/kg	30 dias após o fim do tratamento crônico, 5 minutos

CAF= cafeína; SAL= salina 0,9%.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA E REPRESENTAÇÃO DOS DADOS

Todos os dados experimentais foram submetidos à análise estatística no software Statistica®, versão 10 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Os experimentos 1, 2, 3 e 4 foram submetidos a uma ANOVA de duas vias (linhagem e repetição) de medidas repetidas. Os experimentos 5 e 6 foram submetidos a uma ANOVA de duas vias (linhagem e tratamento). Os experimentos 7 e 8 foram submetidos a uma ANOVA de três vias (linhagem, tratamento e repetição) de medidas repetidas. Os experimentos 9 e 10 foram submetidos a uma ANOVA de duas vias (linhagem e tratamento). Dados com valor de p maiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos e, quando necessário, foi realizado também o teste *post hoc* de Duncan.

As representações em gráfico presentes neste trabalho foram geradas a partir do software GraphPad Prism, versão 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

4. RESULTADOS

4.1. PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

4.1.1. Experimento 1 - Campo Aberto repetido 5 minutos

No CA repetido os animais exploraram o aparato durante 5 minutos por dia, em 5 dias consecutivos. Foi observado um efeito significativo do fator linhagem para os parâmetros: distância percorrida ($F(1,18)=14,124$; $p=0,001$; SLA16>SHR) (Fig. 8A) e porcentagem de locomoção no centro ($F(1,18)=20,867$; $p=0,00001$; SLA16>SHR) (Fig. 8B). Não foi observado um efeito do fator repetição em nenhum dos parâmetros analisados, o que sugere que os animais das duas linhagens não habituam ao longo dos 5 dias de exposição ao CA.

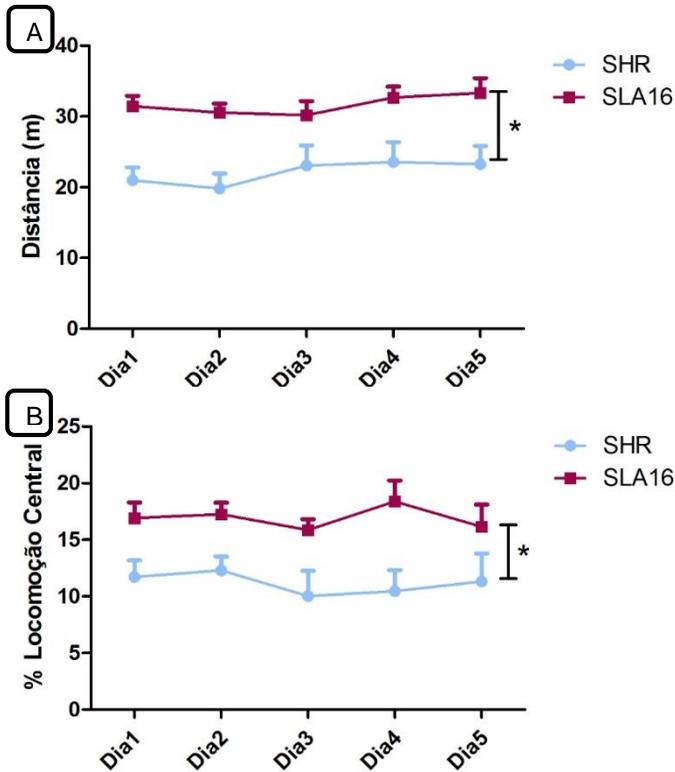


Figura 8. Locomoção no Campo Aberto ao longo dos 5 dias de teste, durante 5 minutos/dia, de ratos SHR e SLA16. (A) Distância total percorrida. (B) Porcentagem de locomoção na área central. Representados média + E.P.M. * = Efeito de linhagem $p < 0,001$

Houve uma interação significativa entre linhagem e repetição em relação ao número de entradas no centro ($F(4,72)=15,296$; $p=0,000001$). O teste *post hoc* de Duncan revelou que nos 4 primeiros dias SHR visitaram mais o centro, já no 5º dia o padrão se inverteu.

Não houve diferenças significativas nos parâmetros de velocidade máxima, velocidade média, tempo no centro e latência para a primeira saída do centro (dados não mostrados).

4.1.2. Experimento 2 - Campo Aberto Repetido 1 hora

Neste segundo experimento, os animais foram testados no CA, durante uma hora diária, por 5 dias consecutivos. Neste protocolo não foi demonstrado efeito significativo do fator linhagem para a distância total percorrida pelos animais SHR e SLA16 (Fig. 9A). Contudo, os dados deste protocolo mostraram um efeito de linhagem ($F(1,10)= 4,920$; $p=0,050$; $SLA>SHR$) e de repetição ($F(4,40)=3,21$; $p=0,022$) significativos para o parâmetro porcentagem de locomoção no centro do aparato (Fig 9B). O teste *post hoc* de Duncan revelou que o 1º dia foi diferente dos demais.

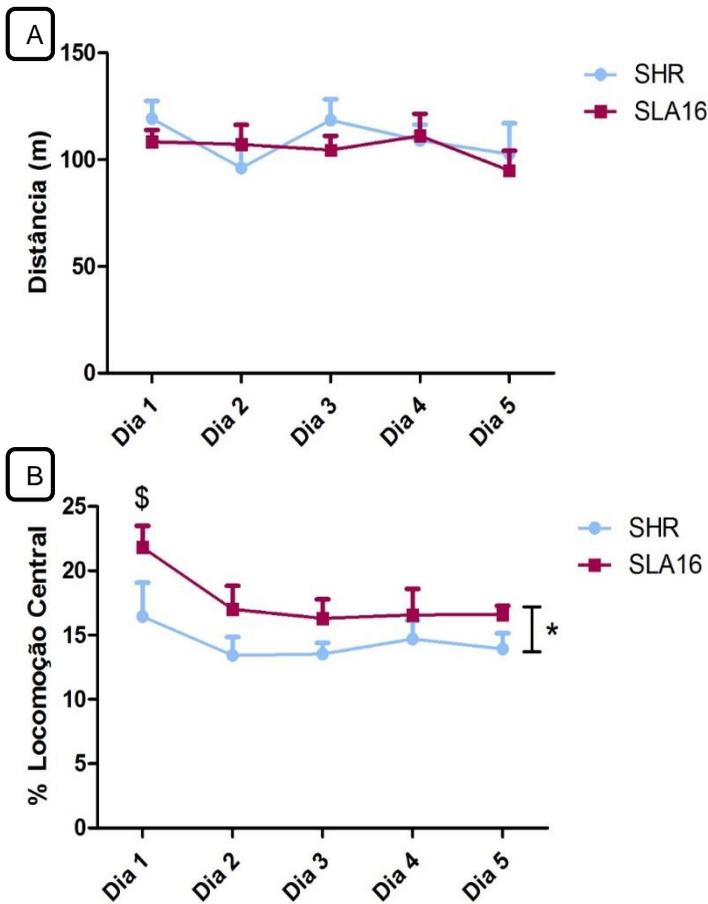


Figura 9. Locomoção no Campo Aberto ao longo dos 5 dias de teste, durante 1 hora/dia, de ratos SHR e SLA16. (A) Distância total percorrida. (B) Porcentagem de locomoção na área central. Representados média + E.P.M. * = Efeito de linhagem com $p < 0,001$. \$ = Efeito de repetição $p < 0,05$.

Não houve diferenças significativas para os parâmetros: número de entradas no centro, velocidade média, velocidade máxima, tempo no centro e latência para primeira saída do centro (dados não mostrados).

4.1.3. Experimento 3 - Caixa de Atividades

Os dados da CAtiv repetida por 5 dias consecutivos, durante uma hora por dia, mostraram um efeito significativo do fator linhagem ($F(1,17)=7,457$; $p=0,014$; $SHR>SLA16$) para a média de locomoção por dia (Fig. 10), com animais SHR se locomovendo mais que os SLA16. Também houve um efeito geral de repetição ($F(4,68)=27,073$; $p=0,00001$). O teste *post hoc* mostrou que os dias 1 e 5 diferem dos demais, tendo a maior e a menor média, respectivamente.

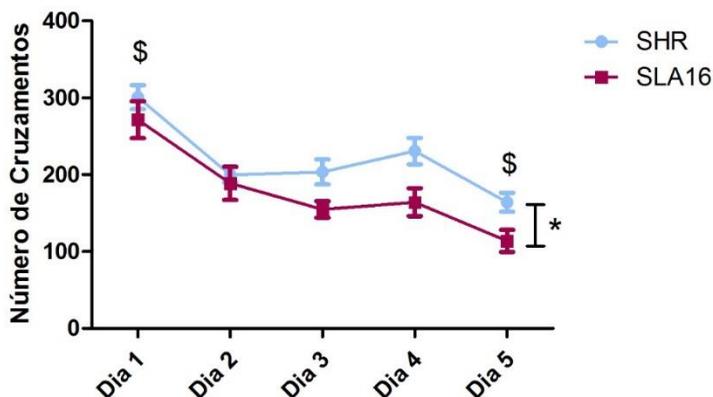


Figura 10. Locomoção total por dia, em números de cruzamentos dos lasers. Representados a média por grupo + E.P.M. * = Efeito de linhagem $p<0,05$; \$ = Efeito de repetição $p<0,001$.

Ao observar a curva mais detalhada (dados plotados a cada 5 minutos) observa-se que SHR e SLA16 têm um perfil similar nos dois primeiros dias (Fig. 11).

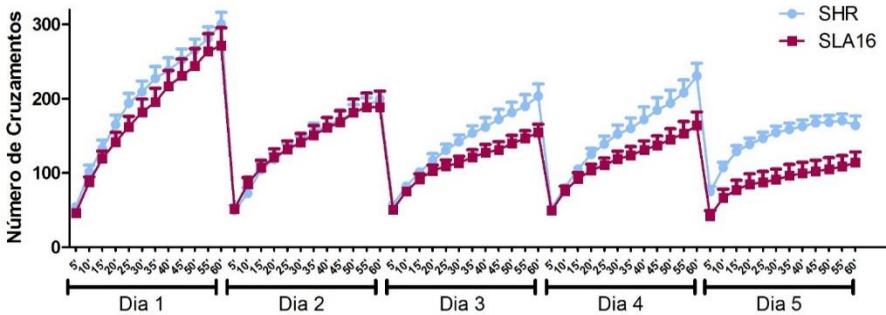


Figura 11. Locomoção a cada 5 minutos, ao longo dos 5 dias, em números de cruzamentos dos lasers. Representados a média por grupo + E.P.M.

4.1.4. Experimento 4 - Labirinto Aquático de Morris

Quando animais *naïve* foram submetidos ao protocolo de avaliação de memória operacional no LAM houve um efeito significativo para o fator repetição ($F(4,56)=31,996$; $p=0,00001$). O teste *post hoc* de Duncan revelou que o primeiro dia diferiu dos demais (Figura 12). Não houve diferenças significativas entre as duas linhagens.

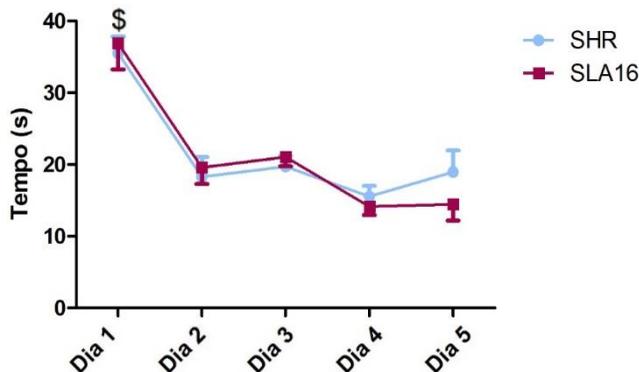


Figura 12. Tempo de latência para encontrar a plataforma de SHR e SLA16. Representados média \pm E.P.M. \$ = Efeito de repetição $p < 0,001$.

Da mesma forma a análise entre as tentativas do mesmo dia mostrou um efeito significativo para o fator repetição ($F(3, 42) = 6,1372, p = ,00148$). O teste *post hoc* de Duncan revelou que a primeira tentativa de cada dia das demais (Figura 13). Não houve diferenças significativas entre as duas linhagens.

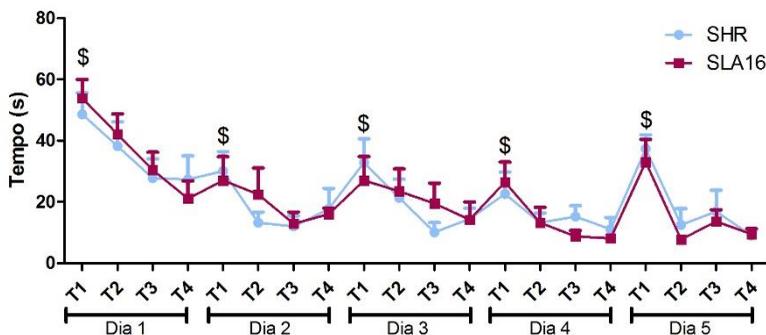


Figura 13. Tempo de latência para encontrar a plataforma de SHR e SLA16. Representados média \pm E.P.M. \$ = Efeito de repetição comparado as tentativas do mesmo dia. $p < 0,001$.

4.2. SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL

4.2.1. Experimento 5 - Efeito Crônico da Cafeína no Campo Aberto ao fim do tratamento

Após o tratamento crônico com CAF durante a adolescência, os animais foram testados no CA, onde foi encontrado um efeito significativo da interação entre linhagem e tratamento ($F(1,28)=4,21$; $p=0,049$) para a distância total percorrida. O teste *post hoc* de Duncan revelou que a cafeína não alterou o comportamento dos SHR, mas sim dos SLA16, diminuindo sua locomoção total (Fig. 14).

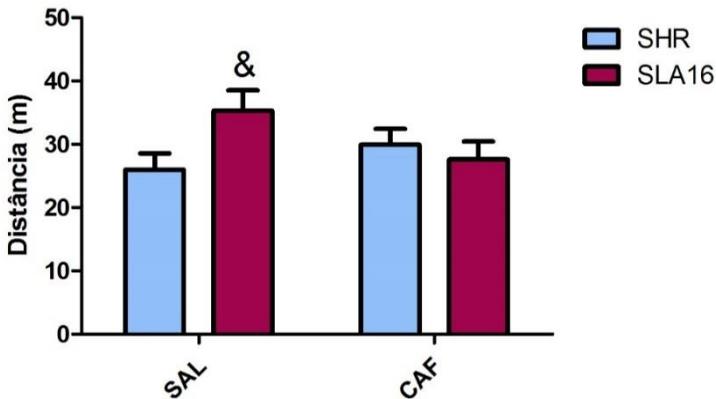


Figura 14. Locomoção Total no Campo Aberto dos grupos tratados com cafeína (CAF) ou salina (SAL) na adolescência. Representados média + E.P.M. & = interação $p < 0,05$ onde a diferença entre linhagens ocorre apenas nos animais tratados com salina.

Da mesma forma, houve um efeito significativo ($F(1,28)=4,22$; $p=0,049$) da interação entre linhagem e tratamento quanto à variável velocidade média dos animais (Fig. 15). O teste

post hoc de Duncan também revelou que a cafeína diminuiu a velocidade média dos SLA16, mas não a alterou nos SHR.

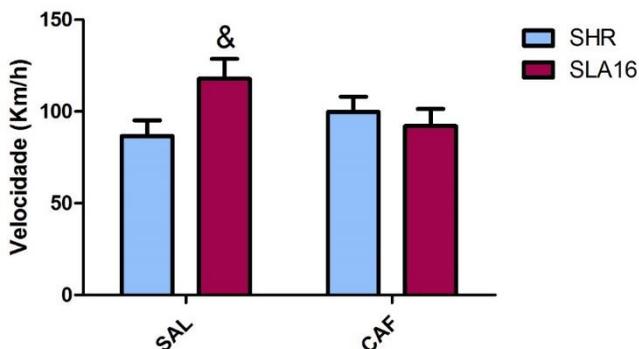


Figura 15. Velocidade média no Campo Aberto dos grupos tratados com cafeína (CAF) ou salina (SAL) na adolescência. Representados média por grupo + E.P.M. & interação $p < 0,05$ onde a diferença entre linhagens ocorre apenas nos animais tratados com salina.

Não houve diferenças significativas nas variáveis: velocidade máxima atingida pelos animais, número de entradas no centro, tempo gasto no centro e porcentagem de locomoção central (dados não mostrados).

4.2.2. Experimento 6 - Efeito Crônico da Cafeína no Campo Aberto 30 dias após o fim do tratamento

Um mês após o fim do tratamento crônico com CAF, os animais foram submetidos ao teste do CA. Neste experimento não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros de locomoção total (Fig 16A), porcentagem de locomoção central (Fig 16B), número de visitas ao centro, velocidade média, velocidade

máxima, tempo de permanência no centro e latência para primeira saída do centro.

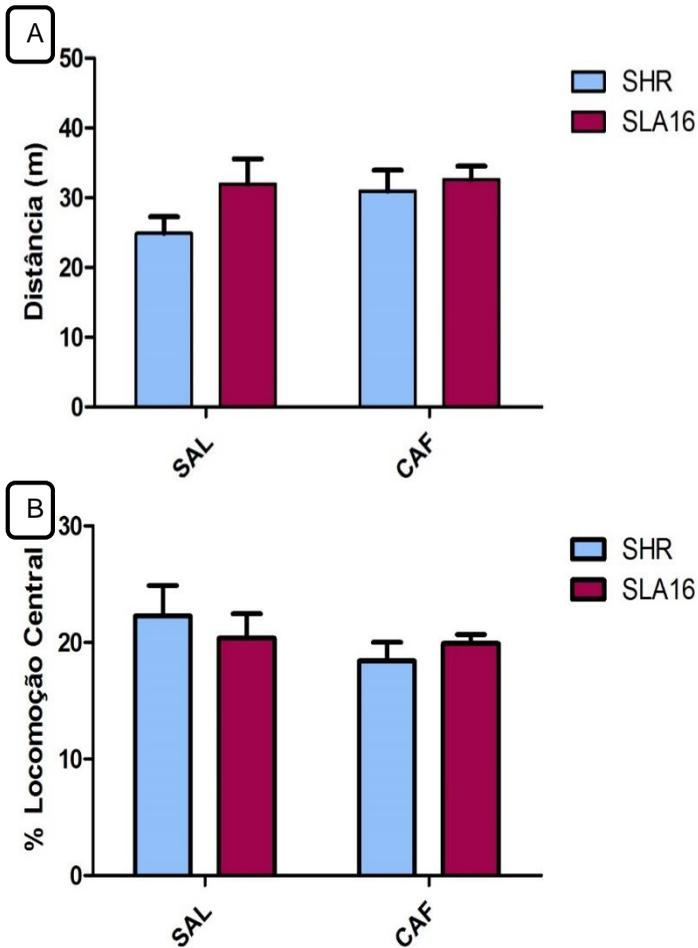


Figura 16. Locomoção dos animais das linhagens SHR e SLA16, tratados com cafeína (CAF) ou veículo (SAL), no Campo Aberto. (A) Locomoção total. (B) Porcentagem de locomoção no centro do aparato. Representadas as médias por grupo + E.P.M.

4.2.3. Experimento 7 - Efeito Crônico da Cafeína no Labirinto Aquático de Morris ao fim do tratamento

Ao fim do tratamento crônico com CAF, os animais foram testados no LAM para avaliar o desempenho das memórias de trabalho e procedimento. Neste experimento foi encontrado um efeito significativo fator repetição entre os dias ($F(4,112)=12,662$; $p=0,00001$). O teste *post hoc* de Duncan revelou que o primeiro dia diferiu dos demais com a maior média entre os dias de experimento (Figura 17). Não foram encontrados efeitos significativos de linhagem ou de tratamento.

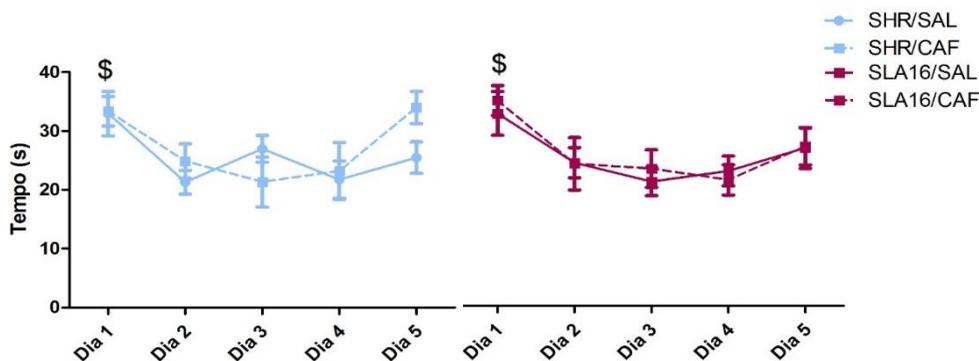


Figura 17. Tempo de latência para encontrar a plataforma no Labirinto Aquático de Morris, ao longo de 5 dias. Representados média dos grupos \pm E.P.M. \$ = Efeito de repetição $p < 0,05$.

A análise a cada tentativa (Fig. 18) não revelou diferenças significativas entre linhagens e tratamentos.

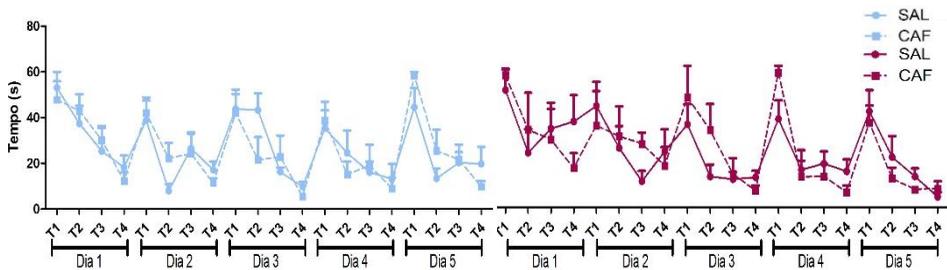


Figura 18. Tempo de latência para encontrar a plataforma no Labirinto Aquático de Morris, ao longo de 5 dias. Representados média dos grupos \pm E.P.M. \$ = Efeito de repetição $p < 0,05$.

4.2.4. Experimento 8 - Efeito Crônico da Cafeína no Labirinto Aquático de Morris 30 dias após o fim do tratamento

Um mês depois do fim do tratamento crônico com CAF durante a adolescência, os animais foram testados no LAM em um protocolo de avaliação da memória de trabalho. Foi encontrado um forte efeito do fator repetição para o tempo de latência para encontrar a plataforma ao longo dos 5 dias de protocolo ($F(4,112)=13,812$; $p=0,0001$). O teste *post hoc* de Duncan revelou que o dia 1 diferiu dos demais em todos os grupos. Além disso, houve uma interação significativa ($F(1,28)=4,583$; $p=0,041$) entre linhagem e tratamento, para este mesmo parâmetro. O teste *post hoc* de Duncan revelou que o grupo de SHR, tratados com cafeína durante a adolescência, teve uma melhora no tempo de latência para encontrar a plataforma, quando comparados com seu controle tratado com salina, nos dias 1, 2, 4 e 5 (Fig. 19).

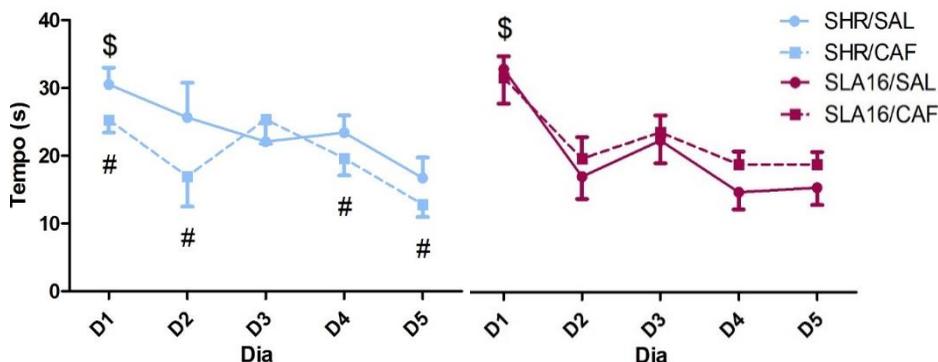


Figura 19. Tempo de latência para encontrar a plataforma no Labirinto Aquático de Morris, ao longo de 5 dias. Representados média dos grupos \pm E.P.M. # = Efeito de tratamento $p < 0,05$; \$ = Efeito de repetição $p < 0,001$.

Da mesma forma, a análise a cada tentativa não demonstrou diferenças entre as linhagens e os tratamentos (Fig. 20).

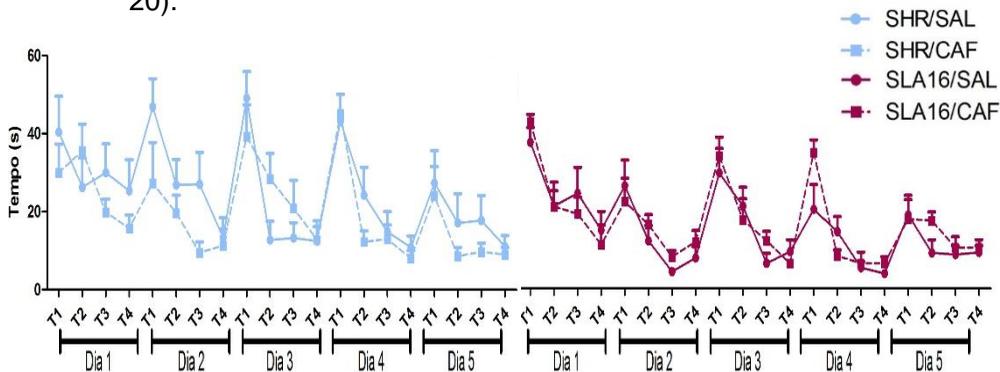


Figura 20. Tempo de latência para encontrar a plataforma no Labirinto Aquático de Morris, ao longo de 5 dias. Representados média dos grupos \pm E.P.M. # = Efeito de tratamento $p < 0,05$; \$ = Efeito de repetição $p < 0,001$.

4.3.1. Experimento 9 - Efeito Agudo da Cafeína no Campo Aberto

Quanto aos dados do CA após injeção aguda de CAF (10 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) houve uma interação significativa entre linhagem e tratamento ($F(1,28)=16,241$; $p=0,00039$) na variável locomoção total (Fig. 21A). O teste *post hoc* de Duncan revelou que o grupo SHR salina foi diferente dos demais, tendo a média mais baixa entre os grupos. Quanto à porcentagem de locomoção no centro houve um efeito significativo do tratamento ($F(1,28)=5,735$; $p=0,024$; CAF>SAL) (Fig. 21B).

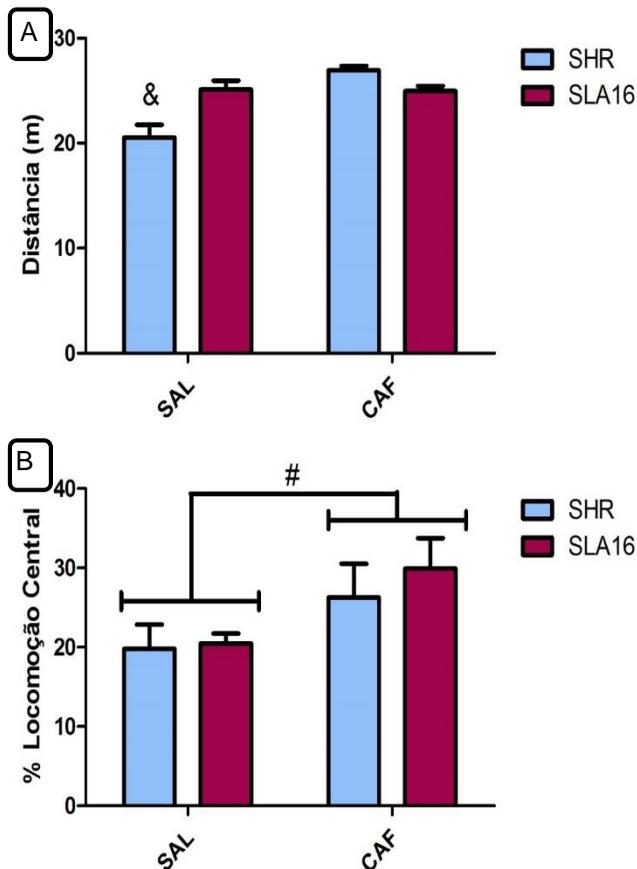


Figura 21. Locomoção no Campo Aberto dos animais das SHR e SLA16, tratados com cafeína (CAF – 10mg/kg) ou veículo (SAL). (A) Distância total percorrida; (B) Porcentagem de locomoção no centro do aparato. Representados média dos grupos + E.P.M. & = Efeito de interação entre linhagem e tratamento $p < 0,05$; # = Efeito de interação entre tratamento $p < 0,05$.

Também foram encontradas diferenças significativas para o fator tratamento ($F(1,28)=12,257$; $p=0,001$; CAF>SAL) quanto ao número de entradas no centro e uma interação entre linhagem e tratamento ($F(1,28)=16,308$; $p=0,00038$) quanto à velocidade

média dos animais (dados não mostrados). O teste *post hoc* de Duncan também mostrou que o grupo SHR salina foi o grupo diferente dos demais, apresentando a média mais baixa.

Não foram encontradas diferenças quanto ao tempo de permanência no centro do aparato, nem quanto à latência para a primeira saída desta área (dados não mostrados).

4.3.2. Experimento 10 - Sensibilidade à Cafeína

Quando reexpostos a uma dose de 10 mg/kg de cafeína, um mês após o fim do tratamento crônico durante a adolescência, os dados mostraram uma interação entre linhagem e tratamento ($F(1,16)=4,497$; $p=0,049$) na variável locomoção total (Fig 22A). O teste *post hoc* de Duncan revelou que o grupo SLA16 previamente tratado com cafeína diferiu dos demais, tendo a maior média entre os grupos. Quanto à porcentagem de locomoção no centro do aparato, houve diferença significativa para o fator linhagem ($F(1,16)=16,368$; $p=0,001$; SLA16>SHR) e para o fator tratamento ($F(1,16)=6,057$; $p=0,026$; CAF>SAL), enquanto a interação entre estes dois não foi significativa ($p=0,083$) (Figura 22B).

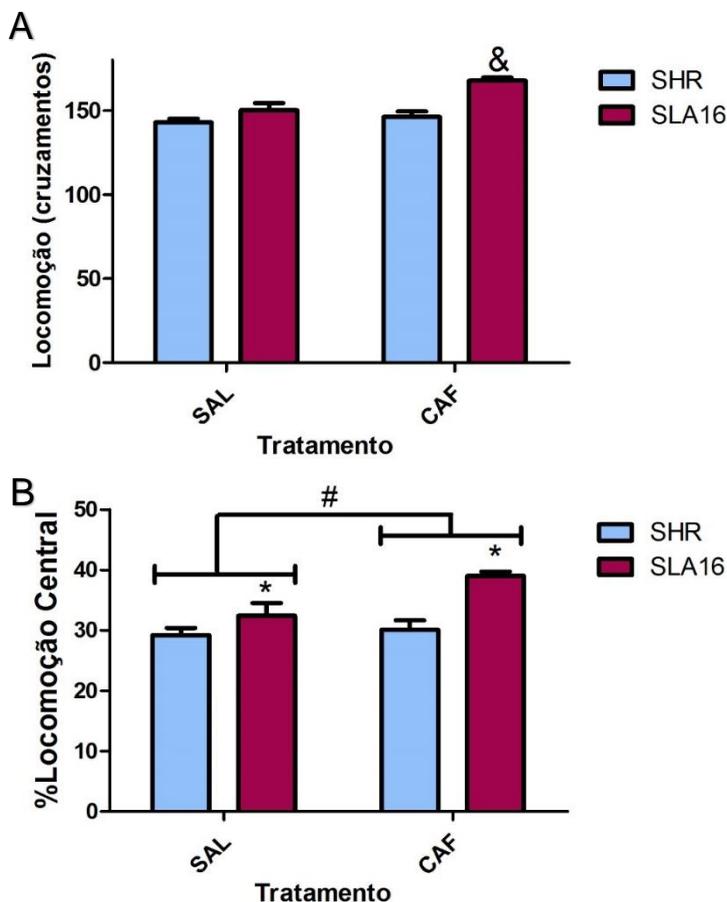


Figura 22. Locomoção dos animais SHR e SLA16, tratados com cafeína (CAF) ou veículo (SAL) no CA. (A) Locomoção total. (B) Porcentagem de locomoção no centro. Representadas médias dos grupos + E.P.M. & = interação entre linhagem e tratamento $p < 0,05$; * = efeito de linhagem $p < 0,001$; # = efeito de tratamento $p < 0,05$.

Não houve diferenças significativas para os parâmetros: tempo no centro e latência para a primeira saída do centro (dados não mostrados).

5. DISCUSSÃO

O TDAH é o transtorno psiquiátrico mais diagnosticado em crianças e adolescentes em idade escolar, uma fase bastante importante no desenvolvimento neurocomportamental. Os tratamentos disponíveis para este transtorno ainda estão longe do ideal, uma vez que não são efetivos em todos os casos e tem vários efeitos adversos.

A pesquisa nesta área ainda tem muito a avançar, buscando novos modelos para ajudar a elucidar os mecanismos neurobiológicos do TDAH e alternativas terapêuticas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial uso da linhagem SLA16 para o estudo de endofenótipos de TDAH, comparando-a com a linhagem SHR, a mais utilizada na atualidade. Além disso, também investigamos a resposta destas duas linhagens ao tratamento crônico com CAF durante a adolescência, uma das apostas alternativas atuais na terapia do TDAH.

Os presentes dados indicam que o uso da linhagem SLA16 para estudo de alguns endofenótipos do TDAH é equivalente ao dos SHR. Ademais, os SLA16 parecem ser ainda melhores em se tratando de hiperatividade frente à novidade. Os dados também indicam um efeito benéfico do tratamento com CAF sobre alguns endofenótipos do TDAH dependendo da linhagem. Outro achado importante deste estudo foi o aumento da sensibilidade dos SLA16, mas não dos SHR, à CAF. Isto indica que o *locus* diferencial parece ter influência na resposta a esta droga, o que

parece refletir em uma diferença farmacogenética entre as linhagens.

5.1. PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

O objetivo do primeiro bloco experimental deste trabalho foi comparar o perfil comportamental dos animais das linhagens SLA16 e SHR, quando repetidamente expostos a testes de emocionalidade, atividade locomotora e memória operacional. Para isso, o primeiro bloco experimental visava avaliar os animais SLA16 e SHR frente a repetidas exposições ao CA e à CAtiv.

Assim, no primeiro experimento, os animais foram expostos ao CA durante 5 minutos, em 5 dias consecutivos para avaliar se os níveis altos de locomoção exibidos pelos SLA16, em relação aos SHR, principalmente no centro do CA (DE MEDEIROS et al., 2013; ANSELMINI et al., 2016), são dependentes do fator novidade neste aparato.

O CA é um aparato clássico utilizado para acessar índices de emocionalidade e locomoção nos roedores (PRUT & BELZUNG, 2003). Neste teste comportamental os animais são colocados em uma situação de confronto entre seu instinto exploratório e a cautela. Os animais tendem a andar próximos às paredes, de maneira que as visitas à área central do aparato, bem como o tempo gasto, podem ser relacionadas a um tipo de comportamento “menos ansioso” (PRUT & BELZUNG, 2003).

Estes índices de emocionalidade podem ser modulados por meio de intervenção farmacológica, como, por exemplo, pela

administração de benzodiazepínicos (STEFANSKI et al., 1992; NAZAR et al., 1999; BERT et al., 2001), agonistas e antagonistas serotoninérgicos (LUCKI et al., 1989; STEFANSKI et al., 1992), ligantes dos receptores de neuropeptídios (BHATTACHARYA, SATYAN & CHAKRABARTI, 1996; BITRAN et al., 1998), entre outros. Outra maneira de modular estes comportamentos é através de manipulações genéticas (DE MEDEIROS et al., 2013).

Os animais SLA16 exibiram maior locomoção total e maior porcentagem de locomoção central em todos os dias do protocolo (Fig. 8A e 8B). Assim os resultados sugerem que esta linhagem mantém seu perfil hiperlocomotor e de menor emocionalidade ao longo dos 5 dias, quando comparados com os seus controles SHR. Isto corrobora que o *locus* diferencial exerce influência sobre a atividade locomotora e emocionalidade (DE MEDEIROS et al., 2013) e sugere fortemente que temos nesta região cromossômica genes muito importantes para se estudar características emocionais, repetidamente ao longo da vida do animal.

Contudo, estes 5 minutos, durante 5 dias consecutivos, não parecem ser suficientes para os animais habituarem-se ao CA, como visto pelos seus índices de atividade locomotora durante os cinco dias. A habituação ao CA parece refletir em uma forma bastante elementar de aprendizado, que é dependente do processamento hipocampal (THIEL et al., 1998). Por exemplo, ratos Wistar que tiveram VTA ou amígdala, lesionados na infância, exibem hiperlocomoção e também não se habitua ao CA, neste mesmo protocolo (DAENEN, et al. 2001). Helmeste (1983) correlacionou o prejuízo de habituação ao CA da linhagem

isogênica Fisher (FIS) às altas densidades de receptores D2 no EST e no bulbo olfatório, quando comparados à linhagem Buffalo, também isogênica. Outro estudo também mostrou um prejuízo na habituação ao CA da linhagem FIS, quando comparada à linhagem LEW, e correlaciona esta com diferenças no sistema límbico (STÖHR et al., 1998). Juntos estes dados sugerem uma influência de áreas cerebrais e do sistema dopaminérgico na habituação ao CA, corroborando uma correlação entre a hipoatividade dopaminérgica e a baixa habituação ao CA. Entretanto, se os animais SLA16 apresentam hipoatividade dopaminérgica, ou mesmo prejuízos em áreas cerebrais relacionados ao aprendizado/memória, como o hipocampo ou amígdala, é um ponto que terá que ser investigado futuramente.

O experimento 2 teve como objetivo, então, avaliar se os níveis altos de locomoção exibidos pelos SLA16, em relação aos SHR, permanecem mesmo após uma hora de exposição ao CA, por cinco dias, e se a habituação ao CA agora seria verificada.

Os resultados mostraram que, quando expostos durante uma hora ao CA, as duas linhagens não diferem para a distância total percorrida, o que sugere que o perfil hiperlocomotor da linhagem SLA16 é dependente da novidade do aparato. A busca por novidade, neofilia, é um traço bastante presente em humanos diagnosticados com TDAH, principalmente com o subtipo impulsivo/hiperativo (PARK et al., 2016), e parece estar diretamente relacionado com a severidade do quadro (PERROUD et al., 2016). Donfrancesco e colaboradores (2015) afirmam,

inclusive, que a busca por novidades deve ser considerada um dos sintomas centrais do TDAH.

Entretanto, a locomoção das duas linhagens também não diminui com o passar dos dias, de tal sorte que nenhuma das duas linhagens parece habituar-se ao aparato (Fig. 9A). Dados da literatura sugerem que pode até mesmo ocorrer um aumento de atividade locomotora por parte dos SHR, com o passar dos dias no CA (KNARDAHL & SAGVOLDEN, 1979; BERGER & SAGVOLDEN, 1998; SAGVOLDEN et al., 2000). Qual é o efeito desafiador, presente no CA, que permanece mantendo um nível alto de locomoção nestas linhagens? Esta é uma pergunta que terá que ser respondida futuramente em nosso laboratório. Além de não ocorrer uma habituação ao CA, mesmo após 5h neste aparato, os SLA16 ainda apresentam uma maior porcentagem de locomoção central em comparação aos SHR. Este resultado reforça o perfil “menos ansioso” desta linhagem e novamente sugere que a linhagem SLA16 seria um modelo genético bastante estável para se estudar características emocionais constantes (Fig. 9B).

A execução do terceiro experimento teve o objetivo de tentar compreender se a ausência de habituação ao CA, verificada nos dois experimentos anteriores, seria também observada em outro teste comportamental. Assim, nós avaliamos animais SLA16 e SHR frente a repetidas exposições à CAtiv, um aparato que teoricamente não apresenta nenhum estímulo desafiador aos animais. Neste aparato os animais de ambas as linhagens foram expostos durante 60 minutos, em 5 dias consecutivos. Os

resultados sugeriram que ocorreu uma habituação, revelada pela diminuição da locomoção com o passar dos dias. Assim, reforçamos a ideia de que um aparato um pouco mais desafiador, como o CA, parece manter o interesse exploratório dos animais por pelo menos 5 dias.

Estes dados levam a crer que quando o aparato expõe o animal a um espaço reduzido, sem grandes desafios, como a CAtiv, ambas as linhagens diminuem sua locomoção, ao longo dos dias, habituando-se ao aparato. De Medeiros e colaboradores (2013) compararam a locomoção de animais da linhagem SLA16 e SHR na CAtiv, em um protocolo de 1 hora de exposição, onde, tanto nos primeiros 10 minutos, quanto nos últimos 10 minutos, SLA16 teve locomoção maior que SHR. Contudo, neste mesmo estudo, os animais foram submetidos a um segundo protocolo com 22,5h de habituação na CAtiv e análise da locomoção na hora seguinte, onde não foram encontradas diferenças entre as duas linhagens.

No último experimento do primeiro bloco experimental os animais foram testados no LAM, um teste bastante versátil, servindo para avaliar diferentes tipos de memória dependendo da maneira como o protocolo é executado (VORHEES & WILLIAMS, 2014; PEREIRA & BURWELL, 2015). Neste trabalho foi usado um protocolo de memória operacional baseado em PREDIGER (2005).

O perfil de animais *naive* de ambas as linhagens foi idêntico. Tanto SHR quanto SLA16 aprenderam a tarefa, o que foi refletido por uma diminuição no tempo para encontrar a plataforma

submersa ao longo dos dias de teste (Figura 12). Anselmi e colaboradores (2016) identificaram QTLs influenciando o aprendizado e memória na região do *locus* diferencial, porém os testes executados envolviam componentes emocionais fortes. Assim, os presentes dados sugerem, pela primeira vez, que a linhagem SLA16 não tem prejuízos neste tipo de aprendizado, que envolve a memória de trabalho e procedimento, em relação ao seu controle genético SHR.

A memória de trabalho é um tipo de memória de curta duração, coordenada principalmente pelo CPF (MILLER, 2000). Algumas evidências mostram que crianças com TDAH têm prejuízos importantes na memória de trabalho (KOFLEER et al., 2010). Vários dados da literatura apontam para um prejuízo em parâmetros de memória e aprendizado por parte dos SHR (WYS, FISK & VAN GROEN, 1992; NAKAMURA-PALACIOS et al., 1996; SAGVOLDEN, 2000; FERGUSON & CADA, 2004; PREDIGER et al., 2005; LEFFA et al., 2016). Entretanto, quanto a protocolos que avaliam memória de trabalho os dados são um pouco contraditórios. Alguns estudos apontam para um desempenho prejudicado dos SHR (TERRY et al., 2000; KANTAK et al., 2008), enquanto outros não encontraram evidências neste sentido (ROBERTSON, CLEMENTS & WAINWRIGHT, 2008; SONTAG et al., 2013).

No conjunto total, os dados obtidos, neste primeiro bloco experimental, corroboram a nossa primeira hipótese sugerindo que a linhagem SLA16 parece ser um modelo genético potencialmente mais interessante que o SHR para o estudo de

alguns endofenótipos relacionados ao TDAH. Concluímos isso, pois, como visto no primeiro bloco experimental, para fenótipos, como os relacionados à memória de trabalho, ou à atividade locomotora após a novidade, as duas linhagens parecem ser equivalentes. Entretanto, para alguns endofenótipos, como a hiperlocomoção em ambientes novos, a linhagem SLA16 seria ainda um melhor modelo genético que a linhagem SHR.

5.2. SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL

Neste bloco experimental o objetivo foi avaliar a emocionalidade, atividade locomotora e memória operacional dos animais das linhagens SLA16 e SHR, frente a um tratamento crônico com cafeína, durante a adolescência. Para isso, as duas linhagens foram tratadas com cafeína dos 24 aos 45 dias de idade e testadas no CA e no LAM, 3 dias após o fim do tratamento ou 30 dias após.

NO CA, o tratamento crônico, com CAF ao longo da adolescência na dose de 2mg/kg, 2 vezes ao dia durante 21 dias, pareceu não ter influência nos comportamentos analisados na linhagem SHR. Neste experimento inclusive se reproduziu a maior locomoção geral, e central dos SLA16 em relação aos SHR, nos grupos tratados com salina (Fig. 13), como verificado no primeiro bloco experimental.

A CAF neste regime de tratamento, porém, diminuiu a locomoção geral dos SLA16, aproximando a média dos SLA16, tratados com CAF, com a média dos SHR independente do

tratamento. Neste contexto, os dados sugerem que a CAF diminuiu a hiperatividade dos SLA16. Já foi descrito que a sensibilidade aos efeitos da cafeína no CA pode variar de uma linhagem de ratos para outra (HUGHES & HANCOCK, 2016). Também, sabe-se que a exposição regular de CAF nesta fase de adolescência desencadeia modificações neurocomportamentais em roedores (PIRES et al., 2010; PANDOLFO et al., 2013; ARDAIS et al., 2014). Por exemplo, um estudo demonstrou que o consumo de cafeína cronicamente nesta fase diminui a imunorreatividade GFAP (um marcador de astrócitos) e a densidade de SNAP-25 (um marcador sináptico) em ratos Wistar (ARDAIS et al., 2014).

Já foi relatado que SHR tratados cronicamente com CAF na adolescência tem uma diminuição do DAT no córtex frontal a níveis considerados normais (PANDOLFO et al., 2013). Também já foi descrito que este tipo de tratamento pode aumentar a densidade de receptores A1 no hipocampo e diminuir a densidade dos mesmos no CPF (ARDAIS et al., 2014). Os receptores adenosinérgicos do tipo A1 são classicamente descritos como os responsáveis pelos efeitos agudos da CAF, enquanto os do tipo A2A seriam os principais responsáveis por seus efeitos crônicos. As mudanças comportamentais, desencadeada pelo tratamento crônico com CAF durante a adolescência, observadas nos SLA16 podem ser reflexo destas modulações neuroquímicas. Mas, estudos futuros em nosso laboratório precisarão confirmar ou não esta hipótese experimental.

Assim, planejamos o experimento 6, para investigar se este efeito era também presente após 4 semanas da interrupção do tratamento com CAF. Quando os animais tratados com CAF ao longo da adolescência foram testados no CA com 11 semanas de idade, não foram encontradas diferenças nos comportamentos analisados. Houve uma tendência de maior média de locomoção no grupo SLA16 salina, comparado com os ratos SHR salina (Fig. 15A), contudo esta não foi significativa.

Para avaliar se este tratamento geraria efeitos diferentes também na memória de trabalho e procedimento, os animais foram então submetidos ao LAM, seguindo mesmo protocolo do primeiro bloco experimental, ao fim e um mês após o tratamento.

No teste realizado ao fim do tratamento com CAF durante a adolescência o perfil das duas linhagens se reproduziu quanto ao aprendizado da tarefa, independente do tratamento. As curvas de aprendizado ao longo dos dias, e entre as tentativas de um mesmo dia, mostram que ambas as linhagens aprenderam a tarefa, mas a CAF pareceu não ter efeito no tempo de latência.

Quando os animais foram testados com 11 semanas, novamente a curva de aprendizado, representada pelo menor tempo de latência para encontrar a plataforma ao longo dos dias, se reproduziu. Contudo, aqui de maneira diferente, o tratamento com CAF pareceu melhorar o desempenho dos SHR, sem alterar o dos SLA16 (Figura 17). Estes dados interessantes corroboram a literatura e sugerem que o tratamento com CAF em baixas doses, durante a adolescência, parece melhorar o desempenho dos animais em diferentes testes de memória (ABREU et al., 2011;

ARDAIS et al., 2014). Falando especificamente dos ratos SHR, este tipo de tratamento nesta fase da vida parece melhorar o desempenho dos animais no teste de reconhecimento de objeto (PIRES et al., 2010), no teste *attentional set-shifting* (usado para avaliar atenção, aprendizado e flexibilidade comportamental) e no labirinto em Y (PANDOLFO et al., 2013).

Efeitos dependentes de linhagem já foram descritos para administrações agudas de CAF (HUGHES & HANCOCK, 2016). A administração aguda de CAF parece melhorar o desempenho dos SHR no LAM (mas não de animais Wistar), em um protocolo de avaliação de memória espacial, quando administrada antes das sessões de treino (PREDIGER et al., 2005). Algumas evidências apontam que a administração aguda também parece melhorar o desempenho dos SHR no teste de reconhecimento social (PREDIGER et al., 2004).

Juntos estes dados apontam para uma evidente melhora no desempenho mnemônico dos SHR tratados com CAF durante a adolescência, o que não parece ser verdadeiro para os SLA16. Por outro lado, a CAF pareceu melhorar a hiperatividade locomotora dos SLA16, sem alterar este fenótipo nos SHR. Assim, os resultados deste segundo bloco sugerem que o *locus* diferencial parece ter alguma influência sobre a resposta ao tratamento crônico com cafeína. Para avaliar se isto também era verdadeiro após uma exposição aguda, conduzimos o último bloco de experimentos.

5.3 TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

O terceiro e último bloco experimental foi proposto para avaliar se o tratamento crônico com CAF, durante a adolescência, influencia a resposta a uma dose aguda de CAF, na fase adulta, dos animais das linhagens SLA16 e SHR. Para isso administramos CAF em animais *naïve*, ou previamente tratados, e avaliamos seu comportamento no CA.

Quando as linhagens SLA16 e SHR foram expostas a uma dose de 10 mg/kg, esta teve um efeito ansiolítico em ambas as linhagens, uma vez que ambas visitaram mais o centro da arena e se locomoveram mais nesta área (figura 18B). A CAF nesta dose também teve um efeito estimulante, refletido por um aumento na locomoção geral (figuras 18A), nos SHR. Já os SLA16 tratados com CAF não pareceram ter diferenças na locomoção, quando comparados aos SLA16 tratados com a solução veículo.

Os dados quanto ao efeito da CAF sobre comportamentos “tipo-ansioso” são diversos na literatura, mas de maneira geral, a administração de CAF aguda parece ter efeito ansiolítico no CA. Hughes e colaboradores (2014) relataram um efeito ansiolítico das doses de 25 e 50 mg/kg em machos e fêmeas da linhagem PVG/c (ratos *hooded*). As doses de 2, 20 e 40 mg/kg também foram relatadas como ansiolíticas no CA (PECHLIVANOVA et al, 2010; SWEENEY et al., 2016), mas ansiogênicas no labirinto em cruz elevado (PECHLIVANOVA et al, 2010). Em outro estudo, os dados mostraram que a dose de 50 mg/kg pareceu gerar um efeito contraditório nas linhagens PVG/c, Long-Evans e Wistar, sendo

mais uma vez ansiolítica quanto às medidas no CA, mas ansiogênica em outros dois aparatos clássicos: o labirinto em cruz elevado e a caixa branca e preta (HUGHES & HANCOCK, 2016).

Por último decidiu-se avaliar se o tratamento crônico com CAF durante a adolescência (2mk/kg) poderia alterar a resposta a uma exposição aguda na fase adulta, gerando tolerância ou sensibilidade à mesma. Assim, animais tratados com CAF ou salina durante a adolescência foram submetidos a um desafio com 10 mg/kg de cafeína.

Da mesma forma que na exposição aguda, a CAF teve um efeito ansiolítico em ambas as linhagens. Aqui, além do efeito do tratamento, pode-se observar também o efeito de linhagem, com SLA16 locomovendo-se mais, em proporção, no centro do aparato (Fig. 20), corroborando mais uma vez o perfil de menor índice de emocionalidade desta linhagem.

O resultado mais curioso foi que a CAF na dose de 10 mg/kg, pareceu ser estimulante apenas no grupo SLA16 previamente tratado com cafeína crônica. Estes dados apontam para uma sensibilidade maior nos SLA16.

Um estudo com animais adultos da linhagem Sprague-Dawley mostrou que a administração de 15 mg/kg de CAF durante duas semanas leva a um aumento de sensibilidade, quanto a locomoção geral no CA (SIMOLA et al., 2006). Outro estudo conduziu o mesmo protocolo de 14 dias de CAF 15 mg/kg em animais, mas com animais WIS, e após reexposição a dose de 10 mg/kg e teste na CATiv, os dados mostraram o aumento da

sensibilidade dos animais, mas só quando as injeções tinham sido pareadas ao aparato (ZANCHETA et al., 2012).

Vale ressaltar que, nos grupos SHR *naive*, a dose de 10 mg/kg de CAF tem um efeito psicoestimulante, mas nos animais expostos ao tratamento crônico durante a adolescência esta mesma dose não parece aumentar a locomoção. Isto leva a crer que, nos SHR, houve uma tolerância maior ao efeito estimulante da CAF. Rhoads e colaboradores (2011) relataram uma tolerância semelhante em ratos da linhagem Long-Evans, expostos a um tratamento crônico com CAF durante a adolescência e mais tarde submetidos a um desafio de CAF.

Os dados deste último bloco experimental sugerem que o *locus* diferencial exerce alguma influência sobre a adaptação sistêmica à administração crônica de CAF durante a fase de adolescência. O *locus* em questão não possui genes descritos para receptores adenosinérgicos nem dopaminérgicos, mas trabalhos anteriores já o correlacionaram com diferenças farmacogenéticas do sistema dopaminérgico (CORVINO, 2015).

O presente trabalho reforça a importância da região do *locus Anxrr16* nos comportamentos exploratórios, de memória e processamento emocional; bem como demonstra o valor da linhagem SLA16 na busca das bases neurobiológicas dos mesmos. Além disto, pela primeira vez o *locus* diferencial é implicado na diferença de resposta a um antagonista adenosinérgico, a CAF.

Nossa hipótese de que o tratamento crônico com CAF durante a adolescência melhoraria traços do TDAH foi confirmada,

uma vez que ele melhorou a hiperatividade dos SLA16 e a memória de procedimento dos SHR. Contudo, é importante notar que os dados indicam uma diferença farmacogenética entre as duas linhagens quanto à resposta à CAF, reforçando que este tipo de tratamento deve ser avaliado com cautela.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os dados encontrados neste trabalho, a linhagem SLA16 parece ser ainda melhor do que a linhagem mais utilizada para o estudo do TDAH, a SHR, em alguns endofenótipos como os relacionados à hiperatividade locomotora em ambientes novos, ou desafiadores. Quanto às memórias de trabalho e procedimento os SLA16 parecem ser equivalentes aos SHR. Isto confirma a primeira hipótese deste trabalho, de que a linhagem SLA16 pode ser um bom modelo para o estudo dos endofenótipos de TDAH.

Quanto às respostas ao tratamento crônico com CAF durante a adolescência, os SLA16 parecem diminuir sua locomoção no CA, mas os SHR parecem melhorar seu desempenho no LAM. Assim, nossa segunda hipótese, de que este tratamento melhoraria endofenótipos de TDAH, também foi confirmada, com a ressalva de que o genótipo influencia diretamente a natureza da resposta.

Outro achado importante do presente trabalho foi que o tratamento crônico durante a adolescência leva a uma maior sensibilidade dos SLA16, mas não dos SHR, frente a uma exposição aguda de CAF na fase adulta. Deste ponto de vista, parece haver um efeito farmacogenético importante, indicando uma influência do *locus* diferencial sobre a resposta a esta droga.

Assim, o presente estudo corrobora o valor da linhagem SLA16 para o estudo de alguns endofenótipos de TDAH e indica que o *locus* diferencial exerce influência sobre a resposta ao

tratamento crônico com CAF durante a adolescência dos animais. As evidências sugerem que a resposta de animais com endofenótipos de TDAH à CAF pode variar de acordo com diferenças genéticas, levando, por exemplo, à sensibilidade. Isto sugere que o uso da cafeína como perspectiva de melhora de endofenótipos de TDAH, bem como uma possível translação para a clínica, devem ser vistas com cautela.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, R.V. et al. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 99, p. 659–664, 2011.

ANSELMINI, M.; CORREA, F.J. et al. Genetic evidence for chromosome 4 loci influencing learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 131, p. 182–191, 2016.

ARDAI, A.P. et al. Caffeine triggers behavioral and neurochemical alterations in adolescent rats. **Neuroscience**, v. 270, p. 27–39, 2014.

BALLARIN, M. et al. Effect of locally infused 2-chloroadenosine, an A1 receptor agonist, on spontaneous and evoked dopamine release in rat neostriatum. **Neuroscience Letters**, v. 185, p. 29–32, 1995.

BARRY, R.J. et al. Caffeine effects on resting-state electrodermal levels in AD/HD suggest an anomalous arousal mechanism. **Biological Psychology**, v. 89, p. 606–608, 2012.

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

BERGER, D.F.; SAGVOLDEN, T. Sex differences in operant discrimination behaviour in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 94, p. 73–82, 1998.

BERT, B. et al. Different effects of diazepam in Fischer rats and two stocks of Wistar rats in tests of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 70 p. 411–420, 2001.

BHATTACHARYA, S.K.; SATYAN, K.S.; CHAKRABARTI, A. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 219-224, 1997.

BITRAN, D. et al. Corticosterone is permissive to the anxiolytic effect that results from the blockade of hippocampal mineralocorticoid receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 60, n. 4, p. 879–887, 1998.

BIZOT, JC. et al. Methylphenidate reduces impulsive behaviour in juvenile Wistar rats, but not in adult Wistar, SHR and WKY rats. **Psychopharmacology**, v. 193, p. 215-223, 2007.

BONAVENTURA, J. et al. Allosteric interactions between agonists and antagonists within the adenosine A2A receptor-dopamine D2 receptor heterotetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 27, E3609–E3618, 2015.

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

BRYDA, E. The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. **Missouri Medicine**, v.110, n. 3, p. 207-210, 2013.

CABALLERO, M. et al. Caffeine improves attention deficit in neonatal 6-OHDA lesioned rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Neuroscience Letters**, v. 494, p. 44–48, 2011.

CAREY, MP. et al. Differential distribution, affinity and plasticity of dopamine D-1 and D-2 receptors in the target sites of the mesolimbic system in an animal model of ADHD. **Behavior Brain Research**, v. 94, p. 173-185, 1998.

CARLEZON, WA Jr; THOMAS, MJ. Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. **Neuropharmacology**. v. 56; p. 122-132, 2009.

CASEY, B.J. et al. Frontostriatal connectivity and its role in cognitive control in parent-child dyads with ADHD. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, p. 1729-1736, 2007.

CHIAVEGATTO, S. et al. Expression of a-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. **Molecular Psychiatry**, v. 14, p. 894–905, 2009.

CHOWDHURY, M.; FILLENZ, M. Presynaptic adenosine A2 and N-methyl-D-aspartate receptors regulate dopamine synthesis in rat striatal synaptosomes. **Journal of Neurochemistry**, v. 56, n. 5, p.1783-1788, 1991.

CIRUELA, F. et al. Adenosine receptor containing oligomers: Their role in the control of dopamine and glutamate neurotransmission in the brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 1245–1255, 2011.

CORVINO, ME. **Investigação da participação do receptor dopaminérgico D2 nas diferenças comportamentais relacionadas à ansiedade/emocionalidade, das linhagens SHR e SLA16**. Florianópolis, 2015.

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

DAENEN, E.W.P.M. et al. Adaptation and habituation to an open field and responses to various stressful events in animals with neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus. **Brain Research**, v. 918, p. 153–165, 2001.

DALLEY, J.W. et al. Attentional and motivational deficits in rats withdrawn from intravenous self-administration of cocaine or heroin. **Psychopharmacology**, v. 182, p. 579-587, 2005.

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

DELLA PEÑA, I. et al. Prefrontal cortical and striatal transcriptional responses to the reinforcing effect of repeated methylphenidate treatment in the spontaneously hypertensive rat, animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Behavioral and Brain Functions**, v. 10, p. 10-17, 2014.

DE MEDEIROS, GF. **Caracterização fenotípica e molecular da linhagem congênica de ratos SHR.LEW-Anxrr16 como um novo modelo genético para o estudo da ansiedade.** Florianópolis, 2012

DE MEDEIROS, GF. et al. Low-Anxiety Rat Phenotypes Can Be Further Reduced through Genetic Intervention. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. 1-12, 2013.

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

DONALDSON, ZR.; HEN, R. From psychiatric disorders to animal models: a bidirectional and dimensional approach. **Biological Psychiatry**, v. 77, p. 15-21, 2015.

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

ERNST, M.; LUCIANA, M. Neuroimaging of the Dopamine/Reward System in Adolescent Drug Use. **CNS Spectrums**, v. 20, n. 4, p. 427–441, 2015.

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

FERGUSON, S.A.; CADA, A.M. Spatial learning/memory and social and nonsocial behaviors in the Spontaneously Hypertensive, Wistar–Kyoto and Sprague–Dawley rat strains. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 583–594, 2004.

FERRÉ, S. et al. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders.

Parkinsonism Related Disorders, v. 10, n. 5, p. 265-271, 2004.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 857–872, 2004.

FLETCHER, P.J., KORTH, K.M., CHAMBERS, J.W. Depletion of brain serotonin following intra-raphe injections of 5,7-dihydroxytryptamine does not alter d-amphetamine self-administration across different schedule and access conditions. **Psychopharmacology**, v. 146, p. 185-193, 1999.

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

FREEDHOLM, BB. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacology Reviews**, v. 51, n. 1, p 83-133, 1999.

FUXE, K. et al. Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 26, p. 209-220, 2005.

GINÉS, S. et al. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 15, p. 8606-8611, 2000.

HEIDBREDER, R. ADHD symptomatology is best conceptualized as a spectrum: a dimensional versus unitary approach to diagnosis. **Attention Deficit and Hyperactive Disorder**, v. 7, p. 249–269, 2015.

HELMESTE, D.M. Spontaneous and apomorphine-induced locomotor changes parallel dopamine receptor differences in two rat strains. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 19, n. 1, p. 153-155, 1983.

HETTINGER, BR et al. Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. **Journal of Comparative Neurology**, v. 431, n. 3 , p. 331-346, 2001.

HILL, J.C.; SCHOENER, E.P. Age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 153, n. 9, p. 1143-1146, 1996.

HUGHES, R.N.; HANCOCK, N.J. Strain-dependent effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in PVG/c, Long–Evans and Wistar rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 140, p. 51–61, 2016.

IONNIDINIS, K.; CHAMBERLAIN, SR.; MÜLLER, U. Ostracising caffeine from the pharmacological arsenal for attention-deficit hyperactivity disorder – was this a correct decision? A literature review. **Journal of Psychopharmacology**, v. 9, n. 8, p. 830-836, 2014.

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

JACOBSON, K.A.; GAO, Z.-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 247-264, 2006.

KANTAK, K.M. et al. Advancing the Spontaneous Hypertensive Rat Model of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 340–357, 2008.

KESSLER, RC. et al. Patterns and predictors of attention-deficit/hyperactivity disorder persistence into adulthood: results from the national comorbidity survey replication. **Biological Psychiatry**, v. 57; n. 11, p. 1442-51, 2005.

KESSLER, RC. et al. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 4, p. 716-723, 2006.

KIELING, C. et al. The age at onset of attention deficit hyperactivity disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 167, n. 1, p. 14–16, 2010.

KNARDAHL, S; SAGVOLDEN, T. Open-field behavior of Spontaneously Hypertensive Rats. **Behavioral and Neural Biology**, v, 27, p. 187-200, 1979.

KOFLER, M.J. et al. ADHD and working memory: The impact of central executive deficits and exceeding storage/rehearsal capacity on observed inattentive behavior. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v. 38, p. 149–161, 2010.

KRÜGEL, U.; KITTNER, H; ILLES, P. Mechanisms of Adenosine 5*-triphosphate induced dopamine release in the rat nucleus accumbens *in vivo*. **Synapse**, v. 39, p. 222–232, 2001.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, DS. Locomotor Effects of Acute and Repeated Threshold Doses of Amphetamine and Methylphenidate: Relative Roles of Dopamine and Norepinephrine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, p. 876-883, 2001.

LEFFA, D.T. et al. Transcranial direct current stimulation improves short-term memory in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *European Neuropsychopharmacology*, v. 26, n. 2, p. 368-377, 2016.

LEHOHLA, M.; KELLAWAY, L.; RUSSEL, V.A. NMDA receptor function in the prefrontal cortex of a rat model for attention-deficit hyperactivity disorder. **Metabolic Brain Disease**, v. 19, n. 1/2, p. 35-42, 2004.

LEO, D. et al. Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 661–669, 2003.

LUCKI, I.; WARD, H.R.; FRAZER, A. Effect of 1-(*m*-chlorophenyl)piperazine and 1-(*m*-trifluoromethylphenyl)piperazine on locomotor activity. **The**

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 249, n. 1, p. 155-164, 1989.

MALAVE, LB; BRODERICK, PA. Caffeine's Attenuation of Cocaine-Induced Dopamine Release by Inhibition of Adenosine. **Journal of Caffeine Research**, v. 4, n. 2, p. 35-40, 2014.

MARCIL, J.; THIBAUT, C.; ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, p. 1009–1022, 1997.

MILLER, E.K. The prefrontal cortex and cognitive control. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 59-65, 2000.

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

MYERS, MM. ; MUSTY, RE. ; HENDLEY, ED. Attenuation of hyperactivity in the spontaneously hypertensive rat by amphetamine. **Behavioral and Neural Biology**, v. 34, p. 42-54, 1982.

NAKAMURA-PALACIOS, E.M. et al. Deficits of spatial learning and working memory in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**, v. 74, p. 217-221, 1996.

NAZAR, M. et al. The role of the hippocampus and 5-HT GABA interaction in the central effects of benzodiazepine receptor ligands. **Journal of Neural Transmission (Vienna)**, v. 106, n. 5-6, p. 369-381, 1999.

OKAMOTO, K.; AOKI, A. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, v. 27, p. 282-293, 1963.

ONALI, P.; OLIANAS, M.C.; BUNSE, B. Evidence that adenosine A 2 and dopamine autoreceptors antagonistically regulate

tyrosine hydroxylase activity in rat striatal synaptosomes. **Brain Research**, v. 456, 302-309, 1988.

PANDOLFO, P. **Papel dos receptores da adenosina em um modelo animal do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade**. Florianópolis: 2010.

PANDOLFO, P. et al. Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 317–328, 2013.

PARK, H., et al. Temperament and characteristics related to attention deficit/hyperactivity disorder symptoms. **Comprehensive Psychiatry**, v. 70, p. 112-117, 2016.

PECHLIVANOVA, D. et al. Dose-dependent effects of caffeine on behavior and thermoregulation in a chronic unpredictable stress model of depression in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 205-211, 2010

PEREIRA, I.T.; BURWELL, R.D. Using the Spatial Learning Index to Evaluate Performance on the Water Maze. **Behavioral Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 533–539, 2015.

PERROUD, N. et al. Personality profiles in adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **BMC Psychiatry**, v. 16, p. 199-208, 2016.

PIRES, V.A. et al. Chronic caffeine treatment during prepubertal period confers long-term cognitive benefits in adult spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Behavioural Brain Research**, v. 215, p. 39–44, 2010.

POLANCZYK, G. et al. The Worldwide Prevalence of ADHD: A Systematic Review and Meta-regression Analysis. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, p. 942–948, 2007.

PREDIGER, R.D.S.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R.N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**, v. 159, p. 197–205, 2004.

PREDIGER, R.D.S. et al. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) – the spontaneously hypertensive rat (SHR). **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 8, p. 583–594, 2005.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3–33, 2003.

RAMOS, A. et al. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular Psychiatry**, v. 4, n. 5, p. 453–462. 1999.

RHOADS, DE. ; HUGGLER, AL.; RHOADS, LJ. Acute and adaptive motor responses to caffeine in adolescent and adult rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, p. 81–86, 2011.

RHODES, SE; KILLCROSS, S; Lesions of rat infralimbic cortex enhance recovery and reinstatement of an appetitive Pavlovian response. **Learning Memory**, v. 11, n. 5, p. 611–616, 2004.

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

ROMANOS, M. Structural abnormality of the substantia nigra in children with attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal Psychiatry Neuroscience**, v. 35, n. 1 p. 55–58, 2010.

RUSSELL, V. et al. Differences between electrically-, ritalin- and D-amphetamine-stimulated release of [3H]dopamine from brain slices suggest impaired vesicular storage of dopamine in an

animal model of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 94, p. 163–171, 1998.

RUSSELL, V. et al. Methylphenidate affects striatal dopamine differently in an animal model for attention-deficit/hyperactivity disorder— The spontaneously hypertensive rat. **Brain Research Bulletin**, v. 53, n. 2, p. 187–192, 2000.

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

SAGVOLDEN, T. et al. The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of childhood hyperactivity (ADHD): changed reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants. **Behavioral and Neural Biology**, v.2, p. 103-112, 1992.

SAGVOLDEN, T. et al. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **Neuroscience & Biobehavior Reviews**, v. 24, n. 1, p. 31-39, 2000.

SAGVOLDEN, T. et al. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1239-1247, 2005.

SEEMAN, P.; MADRAS, BK. Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. **Molecular Psychiatry**, v.3, n.5, p. 386-396, 1998.

SCHNACKENBERG, RC. Caffeine as a substitute for Schedule II stimulants in hyperkinetic children. **American Journal of Psychiatry**, v. 130, p. 796-798, 1973.

SIMOLA, N.; CAULI, O.; MORELLI, M. Sensitization to caffeine and cross-sensitization to amphetamine: Influence of individual response to caffeine. **Behavioural Brain Research**, v. 172, p. 72–79, 2006.

SONTAG, T.-A. et al. Spatial Memory in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, e74660, 2013.

STEFANSKI, R. et al. The comparison of benzodiazepine derivatives and serotonergic agonists and antagonists in two animal models of anxiety. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 12, p. 1251-1258, 1992.

STEINBERG, L. A Social Neuroscience Perspective on Adolescent Risk-Taking. **Developmental Review**, v. 28, n. 8, p. 78-106, 2008.

STOREBO, O.J. et al. Methylphenidate for children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, n. CD009885, 2015.

STÖHR, T. et al. Rat Strain Differences in Open-Field Behavior and the Locomotor Stimulating and Rewarding Effects of Amphetamine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, n. 4, p. 813–818, 1998.

SWEENEY, P. et al. Caffeine increases food intake while reducing anxiety-related behaviors. **Appetite**, v. 101, p. 171-177, 2016.

TERRY, A.V. et al. Deficits in spatial learning and nicotinic-acetylcholine receptors in older Spontaneously Hypertensive Rats. **Neuroscience**, v. 101, n. 2, p. 357–368, 2000.

THANOS, PK. Et al. Dissociation between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar–Kyoto (WKY) rats in baseline performance and methylphenidate response on measures of attention, impulsivity and hyperactivity in a Visual Stimulus Position Discrimination Task. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, p. 374-379, 2010.

THIEL, C.M.; HUSTON, J.P.; SCHWARTING, R.K.W. Hippocampal acetylcholine and habituation learning. **Neuroscience**, v. 85, n. 4, p. 1253-1262, 1998.

TORRES-REVERÓN, A.; DOW-EDWARDS, D.L. Repeated administration of methylphenidate in young, adolescent, and mature rats affects the response to cocaine later in adulthood. **Psychopharmacology**, v. 181, p. 38–47, 2005.

VALVASSORI, S.S. et al. Sensitization and cross-sensitization after chronic treatment with methylphenidate in adolescent Wistar rats. **Behavioural Pharmacology**, v.18, p. 205–212, 2007.

VENDRUSCOLO, LF. et al. Chronic methylphenidate treatment during adolescence increases anxiety-related behaviors and ethanol drinking in adult spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 19, p. 21–27, 2008.

VOLKOW,ND. et al. Caffeine increases striatal dopamine D2/D3 receptor availability in the human brain. **Translational Psychiatry**, v.14, n.5, p. 549, 2015.

VORHEES, C.V.; WILLIAMS, M.T. Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 45, p. 75–90, 2014.

WATANABE, Y. et al. Brain Dopamine Transporter in Spontaneously Hypertensive Rats. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 38, n. 3, p.470-474, 1997.

WINTERSTEIN, AG. et al. Cardiac Safety of Methylphenidate Versus Amphetamine Salts in the Treatment of ADHD. **Pediatrics**, v.124, p. 31-38, 2009.

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

WYS, J.M.; FISK, G.; VAN GROEN, T. Impaired learning and memory in mature spontaneously hypertensive rats. **Brain Research**, v. 592, p. 135-140, 1992.

ZANCHETA, R. et al. Repeated administration of caffeine induces either sensitization or tolerance of locomotor stimulation

depending on the environmental context. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 70-77, 2012.