

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**Papel dos receptores da adenosina em um modelo animal do  
Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade**

PABLO PANDOLFO

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo N.  
Takahashi

**Florianópolis  
2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

P189p Pandolfo, Pablo  
Papel dos receptores da adenosina em um modelo animal  
do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade [tese] /  
Pablo Pandolfo ; orientador, Reinaldo Naoto Takahashi. -  
Florianópolis, SC, 2010.  
134 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Distúrbio da falta de atenção com  
hiperatividade - Modelos animais. 3. Receptores da adenosina.  
4. Canabinóides. 5. Abuso de substâncias. I. Takahashi,  
Reinaldo Naoto. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615





## **AGRADECIMENTOS**

Sou sinceramente grato a todas as pessoas que me ajudaram a realizar este trabalho, especialmente:

- Aos meus pais, Odila e Sérgio, e ao meu irmão, Jeferson, pelo amor incondicional e pelo incentivo em todas as etapas que passei;
- À minha companheira Grasielle Kincheski, pelo apoio e pela história que estamos construindo;
- Ao professor Reinaldo, por despertar a minha visão crítica e pela orientação desde a iniciação científica em 2001;
- Ao professor Rodrigo, por ter aberto as portas do seu laboratório e pela generosidade em compartilhar o conhecimento;
- Aos colegas do laboratório de Psicofarmacologia-UFSC, Carina Nakamura, Fabrício Assini, Meigy Tadaiesky, Sanmara França, Thiago da Silva, Vanessa Pires por tornar o lab um ambiente produtivo e harmonioso. Aos amigos e colaboradores, Cristiane Carvalho, Daniel Rial, Fabrício Pamplona, Leandro Vendruscolo e Rafael Bitencourt pelo ótimo trabalho em equipe;
- Aos colegas do CNC-UC, Alexandre Rodrigues, Ana Patrícia Simões, Ângelo Tomé, Carla Silva, Attila Köfalvi, Elisabete Augusto, Henrique Silva, Manuella Kaster, Marco Matos, Nuno Machado, Paula Agostinho, Paula Canas, Pedro Garção, Rui Sanches, Samira Ferreira, Vasco Silveiriinha pela incrível hospitalidade e por me ensinarem sobre as técnicas neuroquímicas.
- Aos professores do Departamento de Farmacologia, especialmente ao Pádua e ao Rui, por participarem diretamente da minha formação acadêmica;
- Aos funcionários do Departamento de Farmacologia – UFSC e da Universidade de Coimbra – Portugal, pela sempre pronta prestabilidade;
- Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT – Portugal) pelo apoio financeiro.



## RESUMO

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é uma das doenças psiquiátricas mais prevalentes na infância, afetando aproximadamente 5% das crianças em idade escolar. O TDAH está caracterizado pelos sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade, os quais parecem resultar de desequilíbrios dopaminérgicos nos circuitos do estriado (EST) e córtex pré-frontal (CPF). Além disso, a associação entre o TDAH e o abuso de drogas na adolescência e idade adulta está bem estabelecida. Notavelmente, a maconha (*Cannabis sativa*) é a droga ilícita mais usada em indivíduos com TDAH. O metilfenidato (MFD) é um psicoestimulante utilizado como tratamento de escolha no TDAH, podendo causar conseqüências duradouras no desenvolvimento neurobiológico e aumentar o risco para o abuso de drogas. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são considerados como um modelo genético adequado para o estudo do TDAH, uma vez que esta linhagem apresenta características comportamentais e neuroquímicas observadas no transtorno. Visto que as interações entre dopamina e adenosina no sistema nervoso central (SNC) têm sido amplamente estudadas, o objetivo do presente estudo foi investigar se a cafeína (antagonista não seletivo dos receptores de adenosina) previne as modificações comportamentais e neuroquímicas exibidas pelos ratos SHR. Primeiro, ratos SHR e Wistar-Kyoto (WKY) foram tratados com cafeína durante a adolescência e testados na idade adulta nos testes *attentional set-shifting*, campo aberto e labirinto em “Y” antes de serem sacrificados para as análises neuroquímicas de captação de dopamina em terminais nervosos, níveis do transportador de dopamina (DAT) e de receptores D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, A<sub>2A</sub>, e CB<sub>1</sub> no EST e CPF. Além disso, outros alvos também foram investigados em ambas as áreas cerebrais: tirosina hidroxilase (TH), sinaptofisina, (SNAP-25), transportador vesicular de glutamato (VGlut), transportador vesicular de GABA (VGAT) e a co-localização dos receptores A<sub>2A</sub> com DAT, VGlut ou VGAT. Segundo, investigar o papel de antagonistas adenosinérgicos, incluindo a cafeína, sobre os efeitos impulsivos e motivacionais do agonista canabinóide WIN55,212-2 (WIN) em SHR. Os ratos SHR exibiram hiperatividade e baixo desempenho no *attentional set-shifting* e no labirinto em “Y” comparados aos WKY; o tratamento com cafeína melhorou os prejuízos de atenção e de memória em SHR. Os ratos SHR apresentaram níveis elevados de DAT e de captação de dopamina em terminais do EST e do CPF; o tratamento crônico com cafeína eliminou as diferenças entre linhagens para os níveis de DAT e para a captação de

dopamina. Uma maior densidade dos receptores  $A_{2A}$ ,  $CB_1$ ,  $D_1$  e  $D_2$  foi observada em terminais do CPF de SHR. Além disso, a co-localização de  $A_{2A}$ -DAT no EST de SHR estava significativamente menor do que em WKY. O WIN prejudicou a tolerância ao atraso da recompensa e produziu preferência condicionada ao lugar (PCL) em ratos SHR, esses efeitos foram prevenidos pelo pré-tratamento com cafeína. Os efeitos comportamentais do WIN mediados pelos receptores CB não estavam relacionados com pressão arterial. Esses achados indicam o potencial terapêutico da cafeína em tratar os prejuízos de atenção e de memória típicos do TDAH e na relação deste transtorno com abuso de drogas. Os resultados do presente estudo encorajam estudos adicionais para investigar o valor terapêutico da cafeína em pacientes com TDAH.



## **ABSTRACT**

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most prevalent childhood psychiatric disorders, affecting approximately 5% of grade-school children. ADHD is characterized by symptoms of hyperactivity, inattention and impulsivity, which seem to result from the dopaminergic dysfunctions in the prefrontal cortex (PFC) and striatum (ST) circuits. Moreover, the association between ADHD and substance abuse in adolescence and adulthood is well-established. Notably, marijuana (*Cannabis sativa*) is the most popular illicit drug used by ADHD patients. The psychostimulant methylphenidate (MPD) is the prescribed drug of choice for treatment of ADHD, which may cause long-lasting neurobiological developmental consequences and can enhance the risk of substance abuse. Spontaneously hypertensive rats (SHR) are generally considered to be a suitable genetic model for the study of ADHD, since they display the expected behavioral and neurochemical features. Since adenosine-dopamine interactions in the central nervous system (CNS) have been widely studied, the aim of the present study is to evaluate if caffeine (non-selective adenosine receptor antagonist) prevented behavioral and neurochemical modifications in SHR. First, male SHR and Wistar-Kyoto (WKY) were treated with caffeine during adolescence and tested in adulthood in the attentional set-shifting, open field and Y-maze tasks before sacrifice for neurochemical analysis of dopamine uptake by nerve terminals, levels of dopamine transporter (DAT), D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, A<sub>2A</sub>, and CB<sub>1</sub> receptors in the ST and PFC. Moreover, other targets were also investigated in the both cerebral areas: tyrosine hydroxylase (TH), synaptophysin, synaptosome-associated protein 25 kDa (SNAP-25), vesicular glutamate transporter (VGLut), vesicular GABA transporter (VGAT), and co-localization of A<sub>2A</sub> receptors with DAT, VGLut, or VGAT. Second, to investigate the role of adenosinergic antagonists, including caffeine, on the impulsive and motivational effects of the cannabinoid agonist WIN55,212-2 (WIN) in SHR. SHR showed hyperactivity and poor performance in the attentional set-shifting and Y-maze paradigms compared with the WKY; caffeine treatment improved memory and attentional deficits in SHR, while having no effect in WKY. SHR displayed increased levels of DAT and increased dopamine uptake in prefrontal cortex and striatal terminals; chronic caffeine treatment eliminated strain differences in DAT levels and dopamine uptake. A<sub>2A</sub>, CB<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor densities were increased in PFC terminals of SHR. Furthermore, the co-localization A<sub>2A</sub>-DAT in the ST of SHR was significantly lower than in

WKY. WIN lead impairment tolerance to delay and produced conditioned place preference (CPP) in SHR rats, which were prevented by pretreatment with caffeine. The behavioral effects of WIN were CB1-mediated and not related to blood pressure. These findings indicate therapeutic potential of caffeine to manage the attention and memory impairments characteristic of ADHD and in the relationship of this disorder with substance abuse. The present results encourage additional studies to investigate potential therapeutic value of caffeine in ADHD patients.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PREVALÊNCIA APROXIMADA DO TDAH .....	12
FIGURA 2. RELAÇÃO ENTRE A GÊNERO E O PREVALÊNCIA DE ADULTOS COM TDAH. ...	13
FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO METILFENIDATO.....	14
FIGURA 4. VIAS DOPAMINÉRGICAS IMPLICADAS NO TDAH.....	16
FIGURA 5. ESQUEMA DE UM NEURÔNIO DOPAMINÉRGICO NO TDAH.....	17
FIGURA 6. MATURAÇÃO ENCEFÁLICA DURANTE A ADOLESCÊNCIA.....	18
FIGURA 7. MATURAÇÃO DO EST E CPF AO LONGO DOS ANOS.....	20
FIGURA 8. VIAS DOPAMINÉRGICAS EM ROEDORES. ....	25
FIGURA 9. MECANISMO SIMPLIFICADO DOS RECEPTORES DA ADENOSINA.....	28
FIGURA 10. EFEITOS DA CAFEÍNA EM DIFERENTES ALVOS BIOQUÍMICOS. ....	31
FIGURA 11. SINALIZAÇÃO DOS RECEPTORES $D_2$ , $CB_1$ E $A_{2A}$ .....	33
FIGURA 12. TAREFA DE ATENÇÃO E A FLEXIBILIDADE COMPORTAMENTAL.....	41
FIGURA 13. APARELHO UTILIZADO NO TESTE DO CAMPO ABERTO. ....	42
FIGURA 14. PROTOCOLO UTILIZADO NO TESTE DO LABIRINTO EM ‘Y’. ....	43
FIGURA 15. LABIRINTO EM ‘T’ UTILIZADO NO TESTE DE IMPULSIVIDADE.....	45
FIGURA 16. CAIXA E PROTOCOLO UTILIZADOS NO TESTE DA PCL.....	47
FIGURA 17. BOMBA PERISTÁLTICA E GRADIENTE DE PERCOLL.....	49
FIGURA 18. MASSA CORPÓREA DE RATOS WKY E SHR .....	55
FIGURA 19. <i>ATTENTIONAL SET-SHIFTING</i> .....	57
FIGURA 20. CAMPO ABERTO .....	58
FIGURA 21. LABIRINTO EM ‘Y’ .....	59
FIGURA 22. RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS $D_1$ E $D_2$ .....	61
FIGURA 23. TRANSPORTADORES DE DOPAMINA .....	62
FIGURA 24. CAPTAÇÃO DE DOPAMINA .....	63
FIGURA 25. ENZIMA TIROSINA HIDROXILASE .....	64
FIGURA 26. RECEPTORES $A_{2A}$ .....	65
FIGURA 27. RECEPTORES $A_{2A}$ EM TERMINAIS GABAÉRGICOS E GLUTAMATÉRGICOS .....	66
FIGURA 28. CO-LOCALIZAÇÃO $A_{2A}$ E DAT.....	67
FIGURA 29. SNAP-25 E SINAPTOFISINA .....	68
FIGURA 30. RECEPTORES $CB_1$ .....	69
FIGURA 31. IMPULSIVIDADE .....	71
FIGURA 32. PROPRIEDADES AVERSIVAS E REFORÇADORAS DO WIN.....	73
FIGURA 33. PRESSÃO ARTERIAL .....	74
FIGURA 34. ANTAGONISTAS ADENOSINÉRGICOS NA PCL INDUZIDA PELO WIN.....	76
FIGURA 35. INTERAÇÃO $A_{2A}$ E $D_2$ NA PCL INDUZIDA PELO WIN .....	77
FIGURA 36. TRATAMENTO COM CAFEÍNA NA PCL INDUZIDA PELO WIN .....	78
FIGURA I. APÊNDICE I – IMUNOREATIVIDADE PARA SNAP-25, PSD-95 E GFAP.....	125



## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1. MODELOS ANIMAIS PROPOSTOS PARA O ESTUDO DO TDAH.....	23
TABELA 2. TEOR DE CAFÉINA EM ALGUNS ALIMENTOS E BEBIDAS.....	30
TABELA 3. ANTICORPOS PRIMÁRIOS USADOS NA IMUNOCITOQUÍMICA.....	51
TABELA 4. PREPARAÇÃO DOS GÉIS PARA O <i>WESTERN BLOT</i> .....	52
TABELA 5. LISTA DE ANTICORPOS PRIMÁRIOS USADOS NO WESTERN BLOT.....	52
TABELA I. APÊNDICE I – IMUNOREATIVIDADE DOS ANTICORPOS SECUNDÁRIOS. ....	125
TABELA II. APÊNDICE II – CPM E DPM NOS EXPERIMENTOS DE CAPTAÇÃO.....	127



## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidróxi-dopamina
A <sub>1</sub>	Receptor A <sub>1</sub> da adenosina
A <sub>2A</sub>	Receptor A <sub>2A</sub> da adenosina
A <sub>2B</sub>	Receptor A <sub>2B</sub> da adenosina
A <sub>3</sub>	Receptor A <sub>3</sub> da adenosina
AD	Adenosina
AMPc	Adenosina monofosfato-cíclico
ANOVA	Análise de variância
APS	Persulfato de amônio
ATP	Adenosina 5' -trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BSA	Albumina sérica bovina
CA	Campo aberto
CB <sub>1</sub>	Receptor canabinoide 1
CEUA	Comitê de ética para o uso de animais
CPF	Córtex pré-frontal
CPM	Contagem por minuto
CREB	Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DAT KO dopamina	Camundongos com eliminação gênica do transportador de dopamina
DMS	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPCPX	1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthine
DPM	Desintegrações por minuto
E.P.M.	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EST	Estriado
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GPV	Globo pálido ventral
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanossulfônico
i.p.	Via intraperitoneal
MAO	Monoamino oxidase
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MFD	Metilfenidato
NAc	Núcleo <i>accumbens</i>
NGF	Fator de crescimento neural
NHE	Ratos <i>Naple</i> com alta excitabilidade
PA	Pressão arterial
PCL	Preferência condicionada ao lugar
PN	Período pós-natal
PSD-95	Proteína pós-sináptica de densidade 95 kDa

PVDF	Fluoreto de polivinilideno
QP	Quinpirole
s.c.	Via subcutânea
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNAP-25	Proteína de 25 kDa associada a sinaptossoma
SNC	Substância negra parte compacta
SNC	Sistema nervoso central
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TEMED	N'N'N'N'-tetrametilenodiamina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VGAT	Transportador vesicular de GABA
VGlut-1	Transportador vesicular de glutamato
VTA	Área tegmental ventral
WKY	Ratos Wistar-Kyoto
ZM241385	4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol
<sup>9</sup> -THC	<sup>9</sup> -tetrahydrocannabinol



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.....	11
1.2. Adolescência e o desenvolvimento neural.....	18
1.3. TDAH e o abuso de drogas.....	21
1.4. Modelos animais do TDAH.....	22
1.5. Receptores da adenosina e a regulação do sistema dopaminérgico.....	27
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. Animais.....	37
3.2. Drogas e Tratamento.....	38
3.3. Medidas comportamentais.....	39
<i>3.3.1. Atenção e flexibilidade comportamental.....</i>	<i>39</i>
<i>3.3.2. Atividade motora e emocionalidade.....</i>	<i>42</i>
<i>3.3.3. Memória espacial.....</i>	<i>42</i>
<i>3.3.4. Impulsividade.....</i>	<i>43</i>
<i>3.3.5. Propriedades reforçadoras e aversivas.....</i>	<i>45</i>
3.4. Preparação de sinaptossomas.....	47
3.5. Medidas neuroquímicas.....	50
<i>3.5.1. Imunocitoquímica.....</i>	<i>50</i>
<i>3.5.2. Western blot.....</i>	<i>51</i>
<i>3.5.3. Captação de dopamina.....</i>	<i>53</i>
3.6. Pressão arterial.....	53
3.7. Análise estatística.....	54
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
4.1. Massa corporal de ratos WKY e SHR durante o tratamento com cafeína.....	55
4.2. Atenção e flexibilidade comportamental.....	56
4.3. Atividade motora e emocionalidade.....	58
4.4. Memória espacial.....	59
4.5. Receptores de dopamina, subtipos D <sub>1</sub> e D <sub>2</sub> .....	60
4.6. Transportador de dopamina (DAT).....	61
4.7. Captação de dopamina.....	63
4.8. Enzima tirosina hidroxilase.....	63
4.9. Receptores A <sub>2A</sub> da adenosina.....	64
4.10. Receptores A <sub>2A</sub> em terminais gabaérgicos e glutamatérgicos.....	66
4.11. Co-localização de DAT e receptores A <sub>2A</sub> .....	67
4.12. SNAP-25 e sinaptofisina.....	68
4.13. Receptores canabinóides CB1.....	69
4.14. Impulsividade.....	70
4.15. Propriedades aversivas e reforçadoras do WIN na PCL.....	71
4.16. Pressão arterial média.....	73
4.17. Antagonistas de receptores da AD na PCL induzida pelo WIN.....	75
4.18. Interação dos receptores da DA e AD na PCL induzida pelo WIN.....	76
4.19. Tratamento crônico com cafeína na PCL induzida pelo WIN.....	77
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>

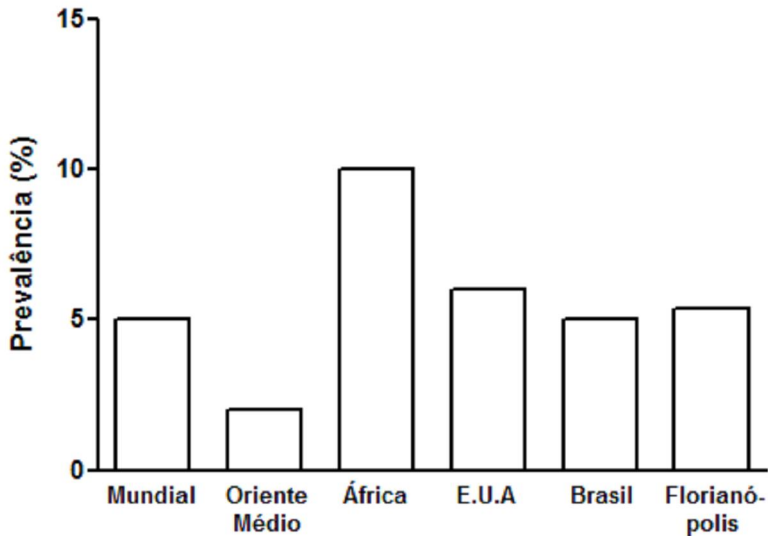


# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

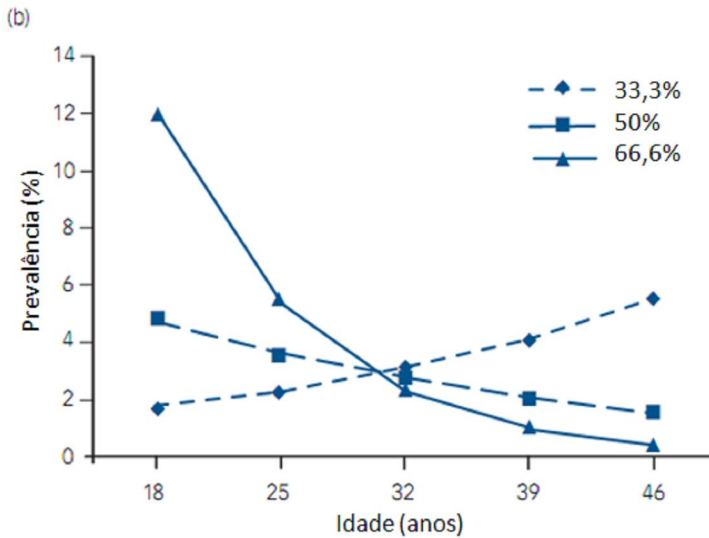
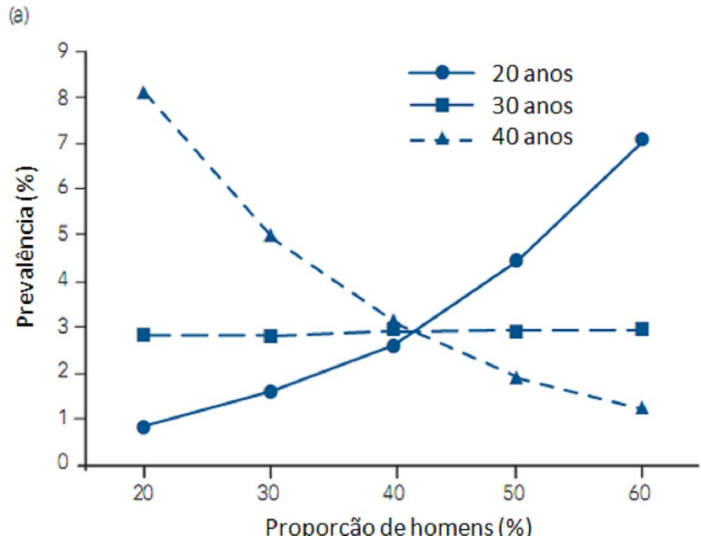
O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é um distúrbio do desenvolvimento que afeta o Sistema Nervoso Central (SNC), sendo geralmente observado na infância e adolescência. De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM – IV (4ª Edição), Texto Revisado (2000), o TDAH está caracterizado por um padrão persistente de desatenção, hiperatividade e impulsividade que começa antes dos 7 anos de idade. Algum prejuízo devido aos sintomas deve aparecer em pelo menos 2 contextos diferentes, por exemplo, em casa e na escola, e causar clara interferência no desempenho social, acadêmico e ocupacional. Embora edições do DSM tragam o início do transtorno antes dos 7 anos, as evidências indicam que a transição entre infância e adolescência pode ser a fase determinante das primeiras manifestações clínicas do TDAH (Kieling, Kieling *et al.*, 2010).

O TDAH é um dos transtornos psiquiátricos mais prevalentes em todo o mundo, estimado em torno de 5% entre as crianças em idade escolar (Polanczyk, De Lima *et al.*, 2007). Apesar de existirem poucos dados com adolescentes e adultos, alguns fatores podem influenciar a prevalência do TDAH. Por exemplo, uma revisão compreendendo estudos realizados de Janeiro de 1978 até Dezembro de 2005 abrangendo quase 180 mil indivíduos de 18 anos ou mais novos e diagnosticados com TDAH mostrou que a localização geográfica é um importante balizador (Polanczyk, De Lima *et al.*, 2007). Segundo este levantamento, existe uma diferença considerável na prevalência (Figura 1) dessa doença entre a América do Norte (~6%), África (~10%) e Oriente Médio (~2%). Além disso, fatores socioeconômicos como problemas familiares, baixos rendimentos financeiros e viver em condições de superlotação estão intimamente relacionados com a severidade dos sintomas no TDAH (Scahill, Schwab-Stone *et al.*, 1999). Em Florianópolis, um estudo realizado com cerca de 2 mil crianças da 1ª a 4ª série do ensino fundamental da rede pública revelou que a prevalência do TDAH é similar à encontrada na população mundial, ou seja, de 5% incluindo ambos os gêneros (Poeta e Rosa Neto, 2004).



**Figura 1.** Prevalência aproximada do TDAH segundo a localização geográfica. Dados retirados de Polanczyk, De Lima et al. (2007) e Poeta e Rosa Neto (2004).

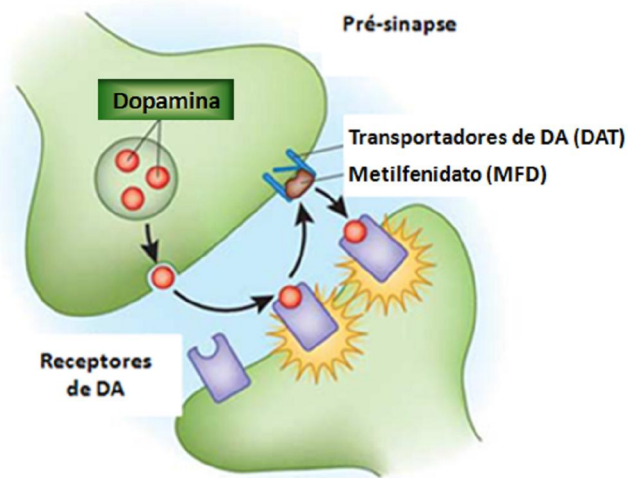
A prevalência e a severidade dos sintomas diminuem, na população em geral, com o avançar da idade (Hill e Schoener, 1996; Heiligenstein, Conyers *et al.*, 1998; Faraone e Biederman, 2005; Kessler, Adler *et al.*, 2006; Fayyad, De Graaf *et al.*, 2007). Porém, acredita-se que o gênero também influencie o percurso do TDAH (Simon, Czobor *et al.*, 2009). Na Figura 2A, a associação da prevalência do TDAH com o gênero está representada em três faixas de idade (20, 30 e 40 anos); pode-se observar que a prevalência aumenta em faixas etárias menores e diminui para os mais velhos em função da proporção de homens na amostragem. Analogamente, a Figura 2B mostra a associação da prevalência com a idade quando o percentual de homens na amostragem é dividido em um terço, metade e dois terços: a prevalência diminui com a idade quando os homens estão representados em 50% ou mais da amostragem e aumenta quando as mulheres estão predominantemente representadas na amostra (proporção do sexo masculino; 33,3%).



**Figura 2.** Relação entre o gênero (masculino %) e a prevalência (%) de adultos com TDAH. (a) Relação entre gênero e prevalência nas idades de 20, 30 e 40 anos. (b) Relação entre idade e prevalência em função do gênero (um terço,

metade e dois terços do sexo masculino). Gráfico adaptado de Simon, Czobor *et al.* (2009).

Embora a maioria dos indivíduos com TDAH apresente sintomas tanto de desatenção quanto de hiperatividade/impulsividade, três subtipos de TDAH podem ser diagnósticos: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo-impulsivo ou o subtipo combinado (DSM-IV-TR, 2000). Geralmente, o tratamento de escolha para os três subtipos é feito da mesma maneira: a prescrição de metilfenidato (MFD), um bloqueador do transportador de dopamina (DAT) (Figura 3). O MFD é uma droga estimulante e, embora isso possa parecer à primeira vista paradoxal, tem consistentemente sido mencionado por melhorar os sintomas do TDAH em aproximadamente 70% dos indivíduos (Spencer, Biederman *et al.*, 1996; Taylor, Dopfner *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Ilustração esquemática do mecanismo de ação do metilfenidato (MFD). O MFD aumenta a disponibilidade de dopamina (DA) na sinapse através do bloqueio dos transportadores de dopamina (DAT) localizados na pré-sinapse. Figura adaptada de Bush (2010).

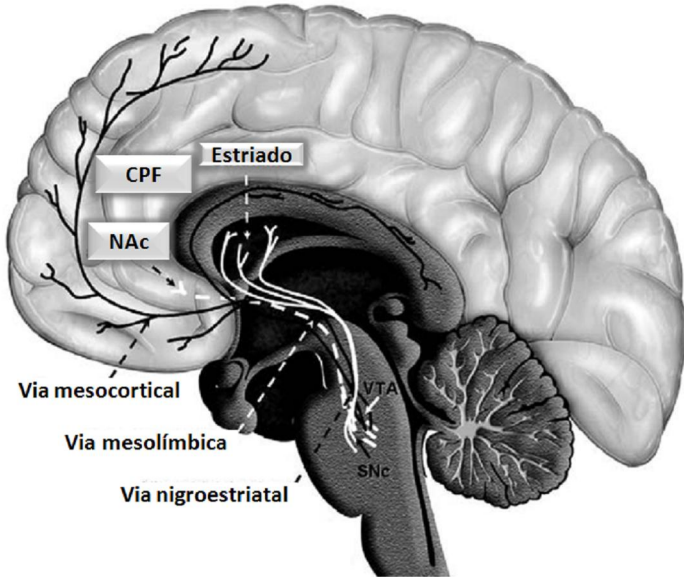
A hipótese neurobiológica mais aceita para o TDAH atribui que uma hipofunção dopaminérgica em áreas corticais, límbicas e motoras do SNC seja a principal responsável pelas alterações comportamentais observadas nos pacientes (Biederman e Faraone, 2002; Tripp e Wickens, 2009). Esta teoria está reforçada pelas evidências clínicas que

demonstram uma melhora substancial na qualidade de vida dos portadores de TDAH tratados, não só com MFD, mas também com outros inibidores da re-captção de dopamina, como a anfetamina (Seeman e Madras, 1998).

As principais áreas do cérebro implicadas na sintomatologia do TDAH são o estriado (EST) e córtex pré-frontal (CPF) (Himelstein, Newcorn *et al.*, 2000). Os neurônios dopaminérgicos que conectam essas regiões formam o circuito corticoestriatal, esses neurônios possuem seus corpos celulares na área tegmental ventral (VTA) e emitem projeções diretamente a diferentes regiões do EST (via mesolímbica e mesoestriatal) ou do CPF (via mesocortical) (Figura 4). Na via mesolímbica, os neurônios dopaminérgicos projetam-se para o núcleo *accumbens* (NAc), uma região do EST, e estendem-se ao CPF para formar a via mesocorticolímbica. Esta via é conhecida como sistema de recompensa, uma vez que medeia a motivação e as respostas gratificantes de drogas de abuso ou de reforçadores naturais como, por exemplo, alimentos, sexo e interação social (Fibiger e Phillips, 1988; Bressan e Crippa, 2005; Carlezon e Thomas, 2009). Na via mesocortical, a DA possui um papel fundamental na organização dos níveis mais complexos da cognição, regulando habilidades como atenção, memória, planejamento e flexibilidade comportamental (Floresco e Magyar, 2006). A integração desses aspectos de forma a definir um comportamento voluntário e objetivo constitui as funções executivas. A flexibilidade comportamental pode ser definida como a capacidade que o sujeito tem de, frente a uma situação nova (p. ex. uma tarefa), reorganizar o comportamento para tentar resolver a situação (Floresco e Magyar, 2006). Além das vias dopaminérgicas originadas na VTA, a via nigroestriatal, que possui neurônios de DA cujos corpos celulares estão situados na parte compacta da substância negra (SNc) e projetam-se para regiões do EST (Figura 4), também participa dos sintomas observados em indivíduos com TDAH (Romanos, Weise *et al.*, 2010).

Embora as vias dopaminérgicas sejam geralmente estudadas separadamente, do ponto de vista funcional existe uma sobreposição no controle das funções executivas, motivacionais e motoras; sendo que cada via contribui de maneira diferenciada nesses processos (McDonald e White, 1993; Haber, Fudge *et al.*, 2000; Everitt e Robbins, 2005). Além disso, o EST e o CPF não são as únicas áreas envolvidas na fisiopatologia do TDAH, os córtices parietais e temporais, que podem inclusive ser controlados por eferências do CPF, também estão

implicados neste transtorno (Rhodes e Killcross, 2004; Casey, Epstein *et*



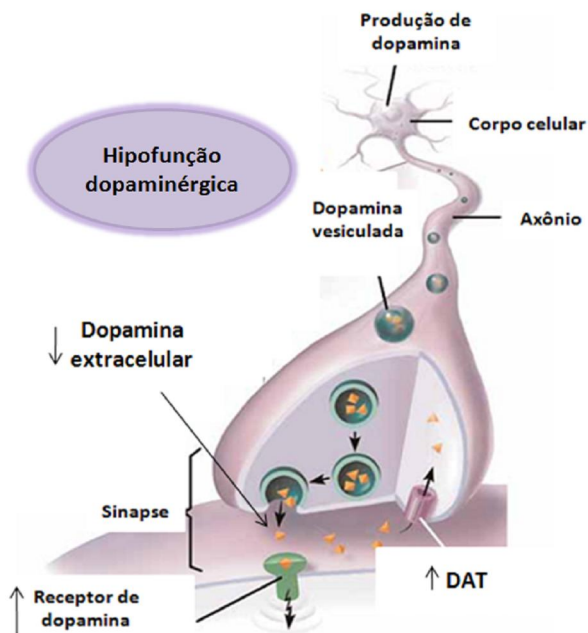
*al.*, 2007).

**Figura 4.** Representação de um corte sagital de cérebro humano, mostrando as estruturas e as vias dopaminérgicas implicadas no TDAH. Ilustram-se as projeções da área tegmental ventral (VTA) ao núcleo *accumbens* (NAc, via mesolímbica) ou córtex pré-frontal (CPF, via mesocortical); e as projeções da parte compacta da substância negra (SNc) às estruturas do estriado (EST, via nigroestriatal). Figura adaptada de Arias-Carrion e Poppel (2007).

Sugere-se que uma atividade aumentada dos DAT (Krause, Dresel *et al.*, 2003) e da monoamino oxidase (MAO), enzima responsável pela metabolização da DA (Stoff, Friedman *et al.*, 1989), contribuam para a hipofunção do sistema de DA observada em indivíduos com TDAH (Figura 5). Dougherty, Bonab e colaboradores (1999) encontraram um aumento de aproximadamente 70% na atividade do DAT em adultos com TDAH. Os efeitos da DA sobre a atividade neuronal podem ser mediados por duas famílias de receptores: D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>) e D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>). Todos, conhecidos até o momento, são receptores metabotrópicos, sendo os da família D<sub>1</sub> acoplados a proteínas G estimulatórias e os da família D<sub>2</sub> a proteínas G inibitórias. Ambas as famílias de receptores podem ser encontradas em interneurônios gabaérgicos e em terminais pré-sinápticos de neurônios glutamatérgicos (Sesack, Snyder *et al.*, 1995; Muly, Szigeti *et al.*, 1998; Wedzony,



Czepiel *et al.*, 2001). No CPF, a expressão dos receptores estimulatórios da família  $D_1$  é substancialmente maior que dos receptores  $D_2$  e  $D_4$  (Gaspar, Bloch *et al.*, 1995); já os receptores  $D_3$  estão fracamente expressos nesta área (Levesque, Diaz *et al.*, 1992). No EST, os receptores  $D_1$  e  $D_2$  estão em predomínio no NAC e os  $D_4$  na pré-sinapse das fibras aferentes corticoestriatal (Tarazi e Baldessarini, 2000; Tarazi, Zhang *et al.*, 2004). Como consequência provável da hipofunção deste sistema, crianças com sintomas de hiperatividade relacionados ao TDAH apresentam também uma densidade aumentada de receptores dopaminérgicos  $D_2$  no cérebro em relação aos indivíduos saudáveis (grupo controle) de mesma faixa etária (Jucaite, Fernell *et al.*, 2005).



**Figura 5.** Esquema simplificado de um neurônio dopaminérgico no TDAH. Destaque para os baixos níveis de DA extracelular e os elevados níveis dos DAT e dos receptores de DA.

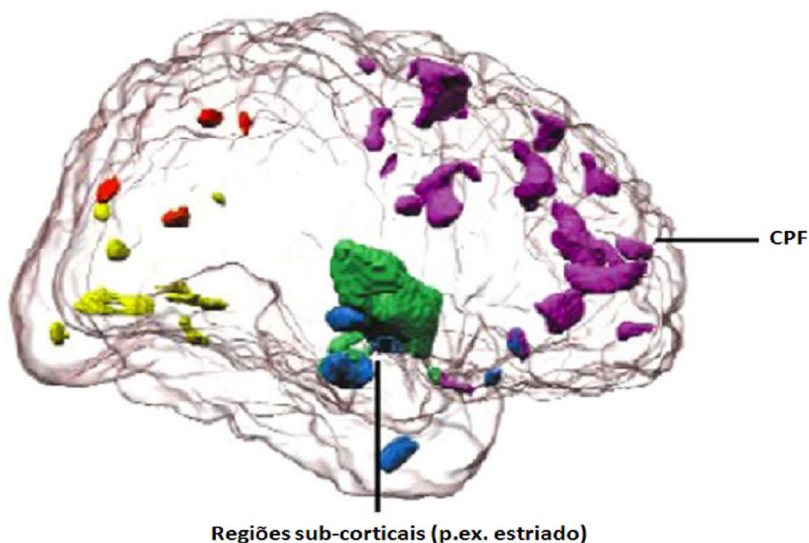
O desenvolvimento do sistema dopaminérgico é pronunciado durante a adolescência. Os traços comportamentais observados em adolescentes podem estar relacionados com a intensa maturação que o EST e o CPF (Figura 6) sofrem durante esta fase (Casey, Getz *et al.*, 2008; Fareri, Martin *et al.*, 2008; Steinberg, 2008). Isto pode explicar

porque este período da vida tem sido considerado determinante na manifestação dos primeiros sintomas do TDAH (Kieling, Kieling *et al.*, 2010).

## 1.2. Adolescência e o desenvolvimento neural

A adolescência é um período da vida caracterizado por um processo complexo de desenvolvimento biológico, psicológico e social. Embora esses aspectos sejam positivos no sentido de sobrevivência individual, a adolescência é um período da vida caracterizado por elevado comportamento de risco (Steinberg, 2008) e de vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos (Kessler, Adler *et al.*, 2005; Paus, Keshavan *et al.*, 2008). O conhecimento sobre a adolescência está mudando, pois atualmente tem-se demonstrado que o cérebro humano continua a se desenvolver durante a adolescência.

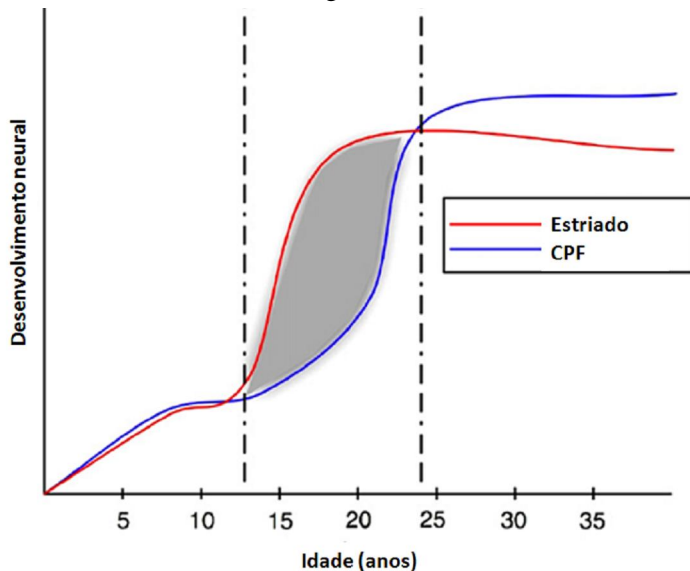
Estudos clínicos utilizando imagens de ressonância magnética mostram uma acentuada diminuição na densidade da massa cinzenta em diversas áreas do cérebro durante períodos de transição entre a infância, adolescência e idade adulta (De Bellis, Keshavan *et al.*, 2001; Sowell, Thompson *et al.*, 2001). Acredita-se que a perda gradual de sinapses, aliada ao fortalecimento das conexões sinápticas remanescentes, coincide com a maturação das habilidades cognitivas durante a infância e a adolescência (Casey, Giedd *et al.*, 2000).



**Figura 6.** Ilustração das regiões do cérebro que sofrem mudanças estruturais durante a adolescência. Em roxo estão representadas as regiões do córtex frontal

e em verde as regiões sub-corticais; córtex parietal (vermelho), córtex occipital (amarelo) e córtex temporal (azul). Figura adaptada de Sowell, Thompson e colaboradores (1999).

Durante a adolescência, o desenvolvimento das áreas corticais do cérebro é mais tardio do que das áreas límbicas (Sowell, Thompson *et al.*, 2003). Esta incompatibilidade temporal na maturação (Figura 7) tem sido atribuída, pelo menos em parte, ao perfil comportamental observado em adolescentes. Por exemplo, o desempenho das funções executivas, tais como o controle inibitório e a memória de trabalho, melhoram continuamente a partir da metade da infância (Gathercole, Pickering *et al.*, 2004; Leon-Carrion, Garcia-Orza *et al.*, 2004; Luna, Garver *et al.*, 2004; Luciana, Conklin *et al.*, 2005). A memória de trabalho é um componente executivo que se refere ao armazenamento temporário de informações para executar uma determinada ação, o qual necessita da integração adequada do EST e do CPF a outras regiões do cérebro (Levy e Farrow, 2001). Por outro lado, a tomada de decisões não apresenta melhoria significativa até a puberdade (Hooper, Luciana *et al.*, 2004; Overman, Frassrand *et al.*, 2004). De modo que o ajuste das habilidades cognitivas depende da maturação do CPF e as regiões por ele integradas através do sistema dopaminérgico, tornando a adolescência um período de vulnerabilidade a doenças psiquiátricas, incluindo o TDAH e o abuso de drogas.



**Figura 7.** Representação do desenvolvimento do EST e do CPF ao longo dos anos. A incompatibilidade entre o desenvolvimento dessas estruturas (área sombreada) é intensa durante a adolescência. Gráfico adaptado de Davey, Yucel *et al.* (2008).

Nesta fase da vida, a densidade de DAT e o número de terminações dopaminérgicas no CPF são maiores do que na idade adulta (Verney, Berger *et al.*, 1982; Kalsbeek, Voorn *et al.*, 1988). De maneira geral, a densidade dos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> atinge o pico durante a adolescência e decai ao longo dos anos até os níveis encontrados na idade adulta (Seeman, Bzowej *et al.*, 1987; Verney, Gaspar *et al.*, 1987; Teicher, Andersen *et al.*, 1995; Andersen, Dumont *et al.*, 1997; Tarazi e Baldessarini, 2000). Para uma revisão detalhada da ontogenia do sistema dopaminérgico, incluindo densidade das inervações dopaminérgica, níveis dos diferentes subtipos de receptores, concentração de DAT, precursores e metabólitos ver Wahlstrom, White e colaboradores (2010).

A adolescência está freqüentemente associada com níveis elevados de agitação e de busca ao prazer (Arnett, Offer *et al.*, 1997; Wills, Sandy *et al.*, 1999). Estudos demonstram que grande parte dos usuários de drogas, como psicoestimulantes e heroína, iniciaram consumindo tabaco e/ou etanol durante a adolescência (Yamaguchi e Kandel, 1984). Por outro lado, indivíduos que começam a consumir etanol na idade adulta apresentam menor probabilidade de passarem a fazer uso de outras drogas (Clark, Kirisci *et al.*, 1998). Estas evidências sugerem que pode haver uma maior vulnerabilidade dos adolescentes aos efeitos de drogas de abuso, o que poderia favorecer o aparecimento de comportamentos relacionados à dependência durante a idade adulta.

Adolescentes consomem drogas por diversos fatores e não existem razões simples pelas quais muitos as consomem, logo, não existem soluções fáceis para resolver esse fenômeno. Esses fatores incluem o rito de passagem da puberdade, o próprio desenvolvimento da adolescência (biológico e psicológico), transtornos mentais como o TDAH e a ampla disponibilidade de drogas (Greydanus e Patel, 2005). Várias teorias foram propostas para a etiologia do abuso de drogas, incluindo o modelo da escalada ou da porta de entrada (do inglês, *Gateway Model*) e o modelo do comportamento de risco proposto por Jessor (do inglês, *Risk Behavior Model of Jessor*). No modelo da escalada ou da porta de entrada, o uso de uma determinada droga aumenta a probabilidade da progressão a outras drogas. Por exemplo, o indivíduo progride do consumo do álcool e tabaco para a cocaína e outras drogas ilícitas (Kandel e Logan, 1984). Já no modelo do comportamento de risco, uma condição psicossocial subjacente pode

explicar o comportamento de risco. Por exemplo, o uso de uma substância é funcional para conseguir objetivos pessoais ou lidar com uma falha, aborrecimento e/ou baixa estima (Jessor, 1991). Outras teorias focam na interação complexa de fatores pessoais (cognição, atitudes, opiniões), fatores genético-fisiológicos e fatores ambientais. Segundo Chambers, Taylor e colaboradores (2003), a maturação dos circuitos encefálicos relacionados à motivação e à tomada de decisões torna a adolescência um período crítico de vulnerabilidade para a falta do controle impulsivo e aumento do comportamento de busca às drogas.

### **1.3. TDAH e o abuso de drogas**

Acredita-se que das crianças diagnosticadas com TDAH 75% permaneçam com os sintomas na adolescência e aproximadamente metade na idade adulta (Schubiner e Katragadda, 2008). Geralmente, o consumo de substâncias psicoativas começa na adolescência ou início da idade adulta e as conseqüências do abuso de drogas afetam cerca 10% da população mundial (Harwood, Sayer *et al.*, 2004). Conforme foi comentado, a associação entre TDAH e o abuso de drogas é bastante comum, o TDAH pode ser um importante fator na patogênese e manutenção da dependência às drogas (Biederman, Wilens *et al.*, 1995; Mcgough, Smalley *et al.*, 2005). O TDAH e o abuso de drogas apresentam similaridades em termos de sistema de transmissão e estruturas cerebrais, como um desequilíbrio dopaminérgico na via mesocorticolímbica (Wilens, 2004).

O NAc, localizado no EST ventral, é uma estrutura chave no sistema de recompensa de mamíferos e pode ser anatomicamente subdividido em duas regiões, a porção *shell* e a *core*. A porção *shell* localiza-se mais ventralmente e está intimamente conectada com a amígdala estendida, uma estrutura composta por um conjunto de regiões límbicas situadas próximas à linha medial, responsável por respostas emocionais em humanos e roedores. A porção *core*, por sua vez, localiza-se mais dorsalmente e relaciona-se com áreas que controlam a função motora (Usuda, Tanaka *et al.*, 1998; Zahm, 2000). O uso de qualquer droga de abuso promove a ativação das células dopaminérgicas da VTA que emitem projeções ao NAc. O NAc conecta-se ao globo pálido ventral (GPV) e a outras áreas importantes para a expressão de comportamentos relacionados à recompensa e a motivação/incentivo (Bardo, 1998; McBride, Murphy *et al.*, 1999; Napier e Mitrovic, 1999). Esse sistema recebe uma extensa modulação neural, incluindo os

sistemas opioidérgicos, serotoninérgicos, gabaérgicos e glutamatérgicos (Leshner e Koob, 1999).

O MFD tem sido considerado útil para a sintomatologia primária do TDAH, isto é, na remissão da desatenção, impulsividade e hiperatividade em cerca de 70% dos casos. Porém, o MFD e os derivados anfetamínicos são drogas com grande potencial de abuso e a relação do tratamento do TDAH com a dependência permanece controversa (Levin e Kleber, 1995). Existem evidências mostrando que a exposição ao MFD durante a infância pode impedir o consumo abusivo de substâncias em ratos (Andersen, Arvanitogiannis *et al.*, 2002) e em humanos (Goodwin, Schulsinger *et al.*, 1975; Wilson e Levin, 2005), ao passo que outros estudos relatam um risco aumentado para o desenvolvimento de dependência (Kaminer, 1995). Logo, a identificação dos mecanismos neurobiológicos subjacentes a associação entre TDAH e o abuso de droga torna-se necessária.

#### **1.4 Modelos animais do TDAH**

Os modelos animais simplificam e promovem o entendimento de vários aspectos biológicos e patológicos de uma determinada doença, constituindo-se como uma importante ferramenta no desenvolvimento de novas terapias. Embora difícil de ser encontrado ou construído, o modelo de doença psiquiátrica mais fidedigno deve atender três critérios de validação: o preditivo, o de analogia e o de homologia (Willner, 1984). O critério preditivo é menos rigoroso e a validação está relacionada com o tratamento da doença, ou seja, a droga utilizada clinicamente e com eficácia terapêutica conhecida deve ter efeito similar no modelo animal. Na validação de analogia, o animal deve mimetizar as características comportamentais observadas na condição humana, como a desatenção, impulsividade e hiperatividade no caso do TDAH. Já para o critério de homologia deve haver uma relação teórica entre o modelo e a neurobiologia da doença.

Várias manipulações moleculares ou genéticas podem produzir animais hiperativos, mas somente o aumento da atividade motora não é suficiente para enquadrá-los como modelo do TDAH. O modelo adequado deve representar outras particularidades do TDAH, ou seja, mimetizar as características fundamentais do TDAH como desatenção, impulsividade e hiperatividade; possuir semelhança genética e molecular com o transtorno, como uma hipofunção dopaminérgica; e as alterações comportamentais dos animais devem responder ao tratamento com MFD. A Tabela 1 mostra a variedade de modelos propostos para o

TDAH e uma análise quanto aos critérios de validação. Os modelos mais estudados incluem os ratos neonatos lesionados com 6-hidróxidopamina (6-OHDA) e pelo menos três modelos genéticos: Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR), ratos *Naple* com alta excitabilidade (NHE) e camundongos com eliminação gênica para o transportador de dopamina (DAT KO).

**Tabela 1.** Modelos animais propostos para o estudo do TDAH. Dados retirados de Davids, Zhang *et al.* (2003); Sagvolden, Russell *et al.* (2005); Russell (2007).

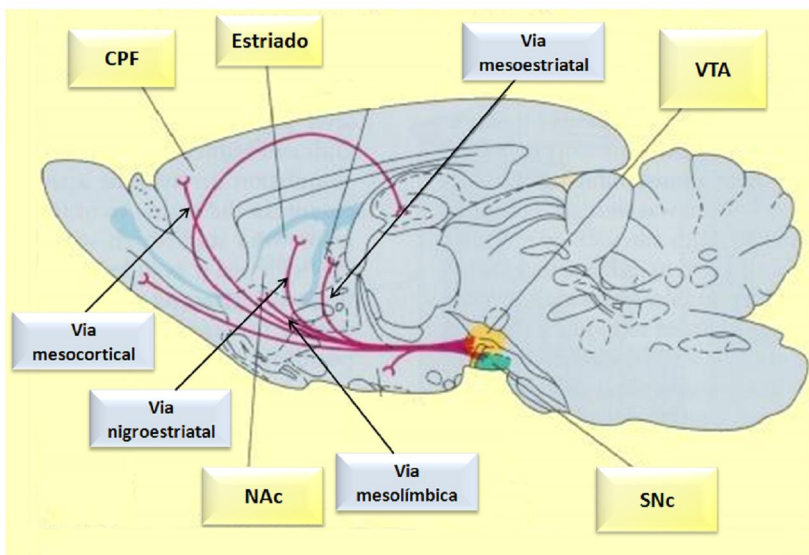
MODELO ANIMAL	ANALOGIA			HOMOLOGIA		PREDITIVO
	HIPERATIVIDADE	DESATENÇÃO	IMPULSIVIDADE	DAT	D <sub>4</sub>	METILFENIDATO
Lesão neonatal com 6-OHDA	SIM	SIM	—	—	SIM	SIM
Modelo da hipóxia neonatal	SIM	—	—	NÃO	—	—
Modelo BrdU-neonatal	SIM	—	—	—	—	NÃO
Stunting Cerebelar	SIM	—	—	—	—	NÃO
Irradiação Cerebelar	SIM	SIM	—	—	—	—
SHR	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
Ratos WKHA	SIM	SIM	SIM	—	—	NÃO
Ratos NHE	SIM	SIM	—	SIM	—	—
Camundongos <i>running</i>	SIM	—	—	—	—	SIM
Camundongos <i>coloboma</i>	SIM	—	—	—	—	NÃO
Camundongos <i>acallosal</i>	SIM	SIM	—	—	—	—
Camundongos DAT KO	SIM	—	SIM	SIM	—	SIM
Camundongos DAT KD	SIM	—	SIM	SIM	—	—
Mutações na tireóide	SIM	SIM	SIM	—	—	NÃO
Rato hiposexual	SIM	SIM	—	—	—	—

Cada um desses modelos apresenta suas vantagens e desvantagens e, de certa forma, cada um deles é capaz de mimetizar uma ou outra característica do TDAH. No entanto, a linhagem SHR tem sido considerada como o melhor modelo animal do TDAH (Sagvolden, Russell *et al.*, 2005; Russell, 2007). Esta linhagem foi desenvolvida a partir da seleção de ratos Wistar-Kyoto (WKY) com fenótipo de hipertensão e, surpreendentemente, os animais apresentavam características neurobiológicas e comportamentais semelhantes às observadas em pacientes com TDAH, como uma hipofunção do sistema dopaminérgico e a tríade de sintomas. Além disso, os ratos SHR apresentam uma relativa diminuição na atividade locomotora e uma melhora nos prejuízos de aprendizagem após o tratamento com MFD (Wultz, Sagvolden *et al.*, 1990; Sagvolden, Metzger *et al.*, 1992; Kantak, Singh *et al.*, 2008).

Como qualquer modelo animal, algumas ressalvas também devem ser feitas ao modelo SHR. Por exemplo, a hiperatividade verificada nestes animais, que é diminuída pelo metilfenidato, é observada apenas quando os SHR são comparados aos WKY (Ramos, Berton *et al.*, 1997). Assim, Sagvolden, Johansen e colegas em recente revisão (2009) alertam que, além da escolha apropriada da linhagem comparativa, sublinhagens de SHR também podem apresentar comportamentos diferentes. Estes autores indicam que o modelo mais fidedigno para estudar o subtipo combinado de TDAH é a linhagem SHR/NCrl oriunda da empresa Charles River – Alemanha. Além disso, o comportamento de qualquer animal pode ser profundamente alterado pela interação gene e ambiente (Crabbe, Wahlsten *et al.*, 1999; Izidio, Lopes *et al.*, 2005; Mcclearn, 2006; Wahlsten, Bachmanov *et al.*, 2006; Mackay e Anholt, 2007). Neste sentido, o presente estudo investigou o perfil comportamental e neuroquímico de SHR/NCrl e WKY/NIcoCrl obtidos da empresa Charles River – Alemanha e rigorosamente mantidos no mesmo ambiente.

Assim como em indivíduos com TDAH, os ratos SHR apresentam uma hipofunção do sistema dopaminérgico corticoestriatal (Figura 8), resultante de uma baixa liberação de DA (Russell, De Villiers *et al.*, 1995), aliada a uma atividade aumentada das enzimas de metabolização da DA, o que diminui a disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica (Boix, Qiao *et al.*, 1998). Além disso, foi demonstrado um prejuízo no estoque vesicular de DA em ratos SHR (Russell, De Villiers *et al.*, 1998). Possivelmente em resposta à hipofunção dopaminérgica, os receptores D<sub>1</sub> tornam-se supra-regulados no EST e CPF de ratos SHR (Watanabe, Fujita *et al.*, 1997; Carey, Diewald *et al.*, 1998). Além disso, foi encontrada uma densidade reduzida de receptores D<sub>4</sub> no CPF de SHR (Li, Lu *et al.*, 2007). E a liberação de DA evocada por estimulação elétrica é significativamente menor nos SHR, tanto no CPF como no EST, em relação aos WKY (Russell, De Villiers *et al.*, 1998; Russell, Allie *et al.*, 2000; Sagvolden, Johansen *et al.*, 2005).





**Figura 8** Representação de um corte sagital de cérebro de rato, mostrando as estruturas e as vias dopaminérgicas responsáveis pelos comportamentos observados na linhagem SHR. De forma correlata aos humanos com TDAH, os ratos SHR apresentam alterações dopaminérgicas nas vias mesolímbica, mesocortical e nigroestriatal. CPF: córtex pré-frontal; NAc: núcleo *accumbens*; SNc: parte compacta da substância negra; VTA: área tegmental ventral.

Considerando a neurobiologia dos SHR e a frequente ocorrência do TDAH com a dependência de drogas, os animais SHR também têm sido propostos como um modelo apropriado para o estudo da relação entre TDAH e abuso de drogas (Vendruscolo, Izidio *et al.*, 2009). Vários estudos têm relatado que a linhagem SHR apresenta uma resposta aumentada a diversas classes de drogas. Por exemplo, os ratos SHR são mais sensíveis aos efeitos estimulantes de derivados anfetamínicos e da cocaína quando comparados a outras linhagens, provavelmente devido à alteração da via dopaminérgica mesolímbica (Tsai e Lin, 1988; Vendruscolo, Vendruscolo *et al.*, 2009). Além disso, têm sido constantemente observado que os SHR consomem mais etanol e são mais sensíveis aos efeitos estimulantes e ansiolíticos do etanol do que outras linhagens (Khanna, Kalant *et al.*, 1990; Cailhol e Mormede, 2001; 2002; Da Silva, Ramos *et al.*, 2004; Vendruscolo, Terenina-Rigaldie *et al.*, 2006; Chiavegatto, Izidio *et al.*, 2009). Por outro lado, existe uma carência de estudos investigando diretamente as propriedades

motivacionais e reforçadoras de outras drogas, incluindo canabinóides em modelos animais do TDAH.

O  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) é considerado o principal responsável pelos efeitos psicoativos de preparações da *Cannabis Sativa*. O  $\Delta^9$ -THC é a substância ilegal mais consumida no mundo, especialmente por adolescentes e jovens adultos (Von Sydow, Lieb *et al.*, 2001). Além disso, o uso de derivados da *Cannabis* pode agravar os sintomas do TDAH e aumentar probabilidade do consumo de outras substâncias de abuso (Fergusson e Boden, 2008). Embora canabinóides sejam amplamente consumidos e abusados por humanos, em animais de laboratório os resultados relativos aos efeitos reforçadores dos canabinóides são inconclusivos. Acredita-se que os canabinóide sejam predominantemente aversivos para roedores; porém, em situações específicas, os canabinóides podem revelar propriedades reforçadoras (Takahashi e Singer, 1979; Mcgregor, Issakidis *et al.*, 1996; Valjent e Maldonado, 2000). Além disso, o sistema canabinóide tem sido reconhecido como um importante modulador do eixo de recompensa (Sperlagh, Windisch *et al.*, 2009). Os receptores canabinóide CB<sub>1</sub> estão relacionados com uma gama de mecanismos transducionais de segundos mensageiros, como a ativação de canais de potássio e de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), e a inibição da adenilato ciclase e de canais de cálcio voltagem-dependente (Bidaut-Russell, Devane *et al.*, 1990; Henry e Chavkin, 1995; Twitchell, Brown *et al.*, 1997; Hoffman e Lupica, 2000). E segundo Robbins (2002), os mesmos substratos que estão implicados no consumo descontrolado de substâncias podem se encontrar desregulados no TDAH.

Apurou-se que a densidade dos receptores canabinóide CB<sub>1</sub> no CPF de ratos SHR adolescentes é menor em comparação aos ratos WKY da mesma idade (Adriani, Caprioli *et al.*, 2003). Beltramo, De Fonseca e colegas (2000) relataram que os SHR são mais sensíveis aos efeitos locomotores do AM404, um inibidor sintético do transporte de anandamida (canabinóide produzido pelo organismo), em relação aos WKY. Além disso, os canabinóides induzem efeitos contrastantes dependendo de aspectos genéticos e ontogênicos (Pandolfo, Pamplona *et al.*, 2007). Por exemplo, os ratos SHR adolescentes são mais sensíveis a estimulação locomotora em ambientes novos do que os adultos, ou em relação aos ratos adolescentes e adultos da linhagem Wistar (Pandolfo, Pamplona *et al.*, 2007). A atividade de roedores em ambientes novos, presumivelmente relacionada com a busca por novidade em humanos, pode prever uma predisposição a auto-administração de drogas

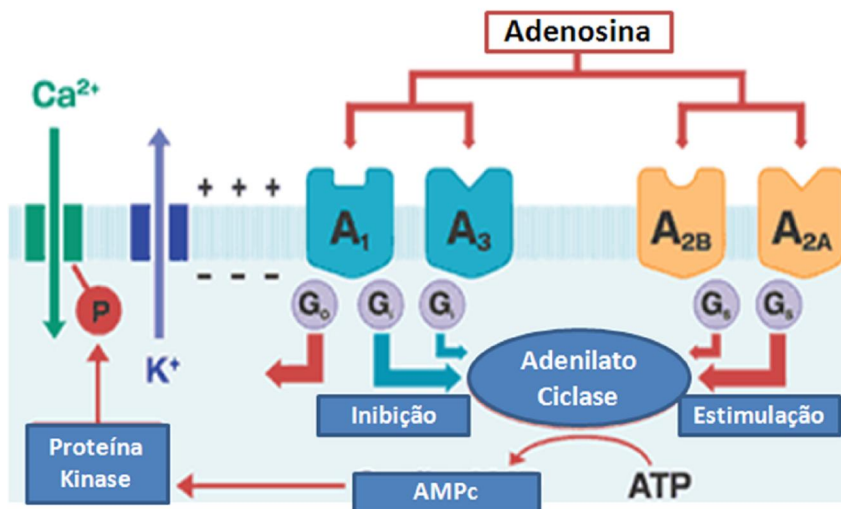
(Klebaour, Bevins *et al.*, 2001; Nadal, Armario *et al.*, 2002). Assim, a adolescência e o perfil relacionado ao TDAH apresentado pela linhagem SHR podem constituir fatores de vulnerabilidade também ao abuso de canabinóides.

O progresso com os estudos moleculares e de imagem forneceu um avanço considerável na nossa compreensão sobre a fisiopatologia do TDAH (Cherkasova e Hechtman, 2009). A busca por genes candidatos tem repetidamente confirmado a participação do sistema dopaminérgico no TDAH e também tem encontrado associações de outras moléculas com o transtorno, como a proteína de 25 KDa associada a sinaptossoma (SNAP25), o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), o fator de crescimento neural (NGF) e o gene da subunidade alfa 4 do receptor nicotínico (CHRNA4) (para uma revisão ver Banaschewski, Becker *et al.*, 2010). O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da cafeína e dos receptores adenosina (ver abaixo) nos parâmetros mais conhecidos e estudados do TDAH, como as alterações comportamentais, os transportadores e receptores de DA, em um modelo validado do TDAH.

### **1.5. Receptores da adenosina e a regulação do sistema dopaminérgico**

Os receptores da adenosina (AD) regulam a ação de diversos sistemas de neurotransmissores, inclusive de vias dopaminérgicas e glutamatérgicas do circuito corticoestriatal (Gomes, Simoes *et al.*, 2009; Quiroz, Lujan *et al.*, 2009). Até o presente momento, quatro diferentes subtipos de receptores para AD (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>), todos acoplados à proteína G, foram clonados e identificados em humanos e roedores (Fredholm, Ap *et al.*, 2001). Os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> inibem a produção do fator transdução adenosina monofosfato-cíclico (AMPC) pelo acoplamento a uma proteína G inibitória (Gi). Por outro lado, os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> ativam a adenilato ciclase através de proteínas G estimulatórias (Gs e G<sub>0</sub>) (Figura 9). Embora os receptores A<sub>2B</sub> também possam ativar a via mediada pela fosfolipase C (PLC) pelo acoplamento a uma proteína Gq (Ryzhov, Goldstein *et al.*, 2006), a AD possui baixa afinidade a esses receptores. A maior afinidade da AD é pelos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>, enquanto os receptores A<sub>3</sub> possuem uma afinidade intermediária (Jacobson e Gao, 2006). Além disso, outros mecanismos transduccionais podem ser recrutados pela ativação dos receptores da AD, tais como o do fosfoinositol-3 quinase (PI3K), das proteínas

MAPKs e da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (Schulte e Fredholm, 2003b; a).



**Figura 9.** Mecanismo simplificado dos receptores da AD e suas sinalizações intracelulares.

Os receptores A<sub>1</sub> estão altamente expressos no córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e no corno dorsal da medula espinhal (Ribeiro, Sebastiao *et al.*, 2002). Os receptores A<sub>2A</sub> estão em alta densidade no NAc e em outras regiões do EST, particularmente em neurônios glutamatérgicos, gabaérgicos e em interneurônios colinérgicos (Jarvis, Jackson *et al.*, 1989; Schiffmann, Jacobs *et al.*, 1991; Kurokawa, Kirk *et al.*, 1994; Latini, Pazzagli *et al.*, 1996; Ongini e Fredholm, 1996; Moreau e Huber, 1999; Ferre, Borycz *et al.*, 2005). Os receptores A<sub>2A</sub> também são expressos no bulbo olfatório e no hipocampo de ratos (Cunha, Johansson *et al.*, 1994; Cunha, Milusheva *et al.*, 1994; Cunha, Johansson *et al.*, 1995; Dixon, Gubitx *et al.*, 1996). Contudo, ambos os receptores podem interferir com transmissão sináptica em várias áreas do cérebro, orquestrando funções como aprendizagem, memória, atividade motora, sono e vigília. Já os receptores A<sub>2B</sub> são fracamente expressos no SNC (Dixon, Gubitx *et al.*, 1996), enquanto que os receptores A<sub>3</sub> aparecem em níveis moderados no cerebelo e hipocampo (Fredholm, Ap *et al.*, 2001; Lopes, Rebola *et al.*, 2003).

A AD tem sido considerada como um maestro na sinapse, uma vez que seus receptores estão localizados em neurônios da pré e pós-

sinapse e em células da glia, onde promovem a homeostasia da função neural (Cunha, 2001). Desta forma, a AD funciona como “sintonizador” de uma complexa interação entre seus próprios receptores e de outros neurotransmissores (Sebastiao e Ribeiro, 2000; Cunha, 2001; Ferre, Ciruela *et al.*, 2007). Um número crescente de evidências tem demonstrado que a AD apresenta efeitos opostos aos da DA no CNS e, por isso, os antagonistas dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  constituem uma promessa terapêutica em distúrbios motores e cognitivos, como a doença de Parkinson, depressão e na dependência às drogas (Brown e Short, 2008; Cunha, Ferre *et al.*, 2008; Takahashi, Pamplona *et al.*, 2008; Sebastiao e Ribeiro, 2009). Embora os portadores dessas doenças também apresentem um desequilíbrio dopaminérgico em sistemas límbicos e no CPF, é surpreendente como o sistema adenosinérgico tenha sido tão pouco estudado no TDAH.

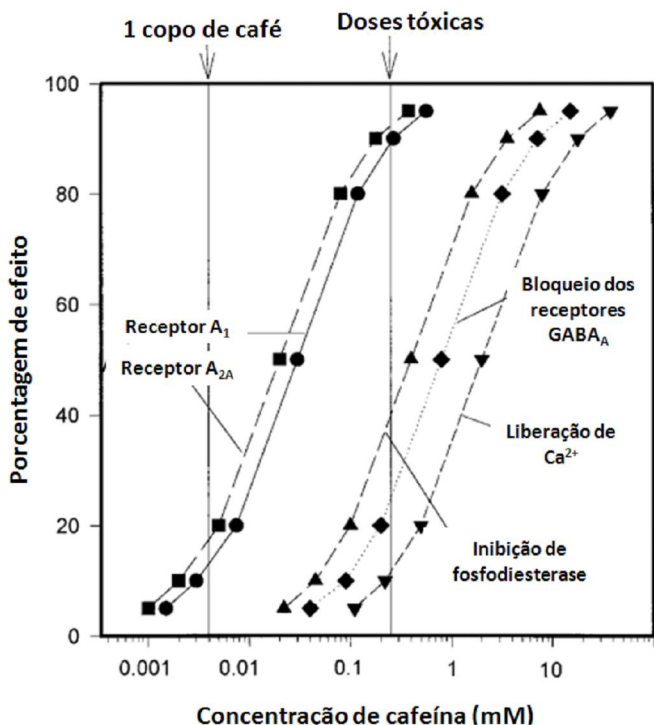
A idade pode alterar o equilíbrio sináptico produzido pelas modulações inibitórias e excitatórias dos receptores da AD em terminais gabaérgicos, glutamatérgicos e dopaminérgicos. A densidade de receptores  $A_1$  no córtex e no hipocampo de ratos idosos está reduzida em relação à de adultos jovens, ao passo que os níveis de  $A_1$  no EST sofrem pouca influência do envelhecimento (Pagonopoulou e Angelatou, 1992; Cunha, Constantino *et al.*, 1995). Por outro lado, ratos idosos apresentam uma densidade elevada de receptores  $A_{2A}$  no córtex e no hipocampo (Cunha, Constantino *et al.*, 1995; Rebola, Sebastiao *et al.*, 2003). Já no EST, parece que a densidade de  $A_{2A}$  diminui com o envelhecimento (Cunha, Constantino *et al.*, 1995). Contudo, a influência dos receptores da AD no processo de maturação do sistema corticoestriatal durante a adolescência precisa ser esclarecida.

Os antagonistas protótipos dos receptores da AD são a cafeína e a teofilina, alcalóides do grupo das xantinas, que são popularmente conhecidos pelos seus efeitos estimulantes. De modo que a cafeína tornou-se a substância psicoativa mais consumida no mundo e pode ser encontrada no café, chá, bebidas de cola e chocolate. O teor de cafeína em um copo de café, por exemplo, flutua em torno de 100 mg, variando de acordo com a preparação e o tipo de café utilizado (Tabela 2). Os efeitos estimulantes da cafeína ocorrem nessa faixa de dose através antagonismo dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  (Fredholm, Battig *et al.*, 1999). Em doses tóxicas (Figura 10) ou em indivíduos sensíveis, a cafeína pode produzir efeitos desagradáveis, tais como ansiedade, agitação, insônia e taquicardia.

**Tabela 2.** Teor de cafeína em alguns alimentos e bebidas. Os dados foram retirados Debray e Nehlig (1994) e Barone e Roberts (1996).

Produto	Volume ou peso	Teor de cafeína (mg)
<i>Café torrado e moído</i>		
Filtrado	100 mL	27-130
Expresso	100 mL	60-180
Descafeinado	100 mL	1-4
<i>Café Instantâneo</i>		
Cafeinado	100 mL	27-120
Descafeinado	100 mL	1-5
<i>Chá</i>		
Instantâneo	100 mL	16-33
Folhas	100 mL	20-32
Gelado	100 mL	19-21
<i>Barra de chocolate</i>		
Ao leite	100 g	3-50
Amargo	100 g	18-125
<i>Refrigerante</i>		
Cola	100 mL	8-13
Cola Diet	100 mL	7-16

Estima-se que o consumo mundial de cafeína, incluindo todas as fontes de consumo, esteja por volta de 75 mg/pessoa/dia; já no Brasil, o consumo fica na faixa de 40 mg/pessoa/dia (Fredholm, Battig *et al.*, 1999). Além dos alimentos e bebidas citados na tabela 2, o mate ou chimarrão, preparados a partir das folhas da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), é uma fonte de cafeína muito utilizada no sul do Brasil, Paraguai e Argentina. Cinquenta gramas de erva-mate processada, suficiente para fazer 1 litro de chimarrão, contém aproximadamente 160 mg de cafeína. Além disso, a *Paullinia cupana* é uma planta nativa da Amazônia, conhecida como guaranazeiro que produz o fruto guaraná. A semente do guaraná, utilizada na preparação de comidas e bebidas, pode conter de 2 a 5% (do peso seco) de cafeína; um teor maior do que o encontrado no café: 1 a 2%.



**Figura 10.** Efeitos da cafeína em diferentes alvos bioquímicos em função dos níveis plasmáticos em humanos. Observe que a cafeína bloqueia significativamente os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> da AD em baixas concentrações; obtidas após o consumo de apenas uma xícara de café. A inibição de fosfodiesterases pela cafeína ocorre em concentrações 20 vezes maiores e para bloquear os receptores GABA<sub>A</sub> são necessárias concentrações 40 vezes maiores, a mobilização dos estoques intracelulares de Ca<sup>2+</sup> ocorre somente com o aumento de 100 vezes na concentração plasmática de cafeína. Estes níveis são praticamente impossíveis de se alcançar com o consumo de bebidas ou alimentos. Figura adaptada de Fredholm, Battig *et al.*(1999).

Uma explicação mecanística para os efeitos estimulantes da cafeína partiu de um estudo mostrando que a ativação dos receptores A<sub>2A</sub> diminuía a afinidade dos receptores D<sub>2</sub> em membranas do EST de ratos (Ferre, Von Euler *et al.*, 1991). A partir daí, vários estudos confirmaram as interações físicas e funcionais entre os receptores de AD e DA (Ferre, O'connor *et al.*, 1994; Ferre, Popoli *et al.*, 1994; Mayfield, Jones *et al.*, 1999; Ferre, Ciruela *et al.*, 2007). Por exemplo, no EST os receptores A<sub>2A</sub> podem ser co-expressos com receptores D<sub>2</sub> (Fuxe, Ferre

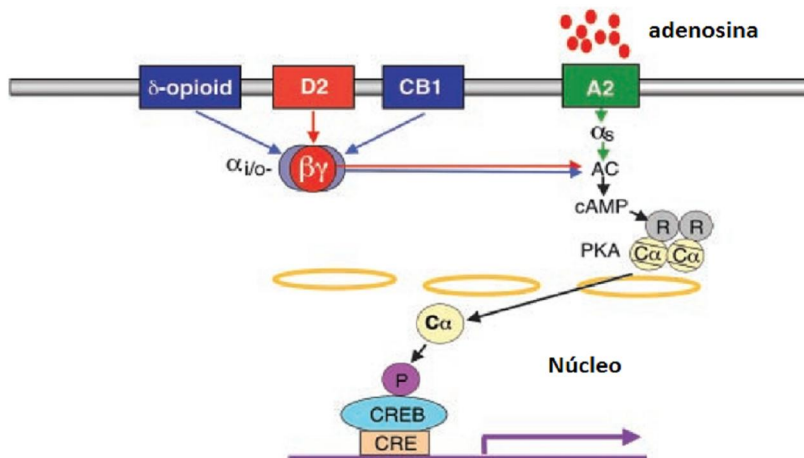
*et al.*, 1998) ou CB<sub>1</sub> (Carriba, Ortiz *et al.*, 2007) e os receptores A<sub>1</sub> podem formar dímeros com os receptores D<sub>1</sub> (Franco, Lluís *et al.*, 2007). Além disso, a formação de homo ou heterodímeros também pode ocorrer entre os receptores da AD (Franco, Lluís *et al.*, 2007). Os heterodímeros A<sub>1</sub>-D<sub>1</sub> também estão presentes nos núcleos da base e no CPF, especialmente em vias gabaérgicas; e interações entre os receptores A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> podem ser encontradas em vias gabaérgicas do EST dorsal e ventral (Ferre, Quiroz *et al.*, 2008). O grau de complexidade dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> em modular a atividade dos neurotransmissores vai além dessas interações, o sistema adenosinérgico pode regular uma miríade de eventos celulares (Ciruela, Albergaria *et al.* 2010; Sebastiao e Ribeiro, 2009).

Apesar dos efeitos benéficos da cafeína ou de antagonistas seletivos A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> nas alterações motoras e cognitivas terem constantemente sido documentados, os estudos que avaliam os efeitos terapêuticos da cafeína sobre o TDAH em humanos são insuficientes e inconclusivos. Alguns trabalhos indicaram que a cafeína por si ou em associação com o MFD melhora os sintomas do TDAH (Garfinkel, Webster *et al.*, 1975a; Arnold, Christopher *et al.*, 1978; Garfinkel, Webster *et al.*, 1981; Dalby, 1985; Schechter e Timmons, 1985) e outros trabalhos mostraram efeitos similares ao placebo (Garfinkel, Webster *et al.*, 1975b; Huestis, Arnold *et al.*, 1975; Conners, 1979). Entretanto, esses trabalhos possuem uma série de limitações que comprometem a identificação do valor terapêutico da cafeína para o TDAH. Por exemplo, parte dos estudos foi conduzida com um grupo muito pequeno da amostra (6-8 indivíduos) e os critérios, assim como a terminologia, do TDAH conhecidas atualmente foram somente descritas a partir de 1987 (DSM-III). Apesar de não existirem trabalhos recentes investigando os efeitos da cafeína ou de antagonistas adenosinérgicos em humanos com TDAH, perspectivas do potencial terapêutico dessas drogas têm surgido de estudos comportamentais com a linhagem SHR (Prediger, Fernandes *et al.*, 2005; Prediger, Pamplona *et al.*, 2005; Pires, Pamplona *et al.*, 2009; Pires, Pamplona *et al.* 2010). Estes estudos focaram principalmente em tarefas de aprendizagem discriminativa e reconhecimento espacial; mas características como desatenção, impulsividade, hiperatividade e os mecanismos moleculares subjacentes a esses comportamentos permanecem por serem elucidados.

Conforme foi mencionado, os antagonistas adenosinérgicos têm sido considerados promissores no tratamento da dependência às drogas. Yao, Mcfarland e colaboradores (2006) relataram que os receptores A<sub>2A</sub>



são fundamentais na atividade transducional dos receptores opióides, dopaminérgicos e canabinóides no NAc, e o antagonismo dos A<sub>2A</sub> pode eliminar o desejo compulsivo em ratos considerados dependentes de heroína. Assim, foi demonstrado que os receptores A<sub>2A</sub> compartilham mensageiros intracelulares com os receptores  $\delta$ , D<sub>2</sub> e CB<sub>1</sub> (Figura 11), de modo que agonistas A<sub>2A</sub> causam efeitos sinérgicos com esses receptores, que culmina na ativação de mensageiros intracelulares da via PKA (Yao, Fan *et al.*, 2003). Então, pelo fato da adenosina ser necessária para a ativação sinérgica dessa via, o tratamento com antagonistas de receptores A<sub>2A</sub> poderia diminuir o abuso de drogas.



**Figura 11.** Representação esquemática do compartilhamento da sinalização intracelular mediada pelos receptores opióides, D<sub>2</sub>, CB<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>. A ativação dos receptores de  $\delta$ , D<sub>2</sub> ou CB<sub>1</sub> induz a expressão gênica mediada pela proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB). Linhas azuis representam a ativação dos receptores  $\delta$  e CB<sub>1</sub> com os receptores D<sub>2</sub> (linhas vermelhas). A ativação de A<sub>2A</sub> é fundamental para a sinergia dessa transdução. Figura adaptada de Yao, Fan *et al.* (2003).

Considerando os fatos apresentados na Introdução e que o MFD pode causar consequências duradouras no desenvolvimento neurobiológico quando o tratamento é feito durante a infância e adolescência, incluindo um aumento no risco de dependência às drogas (Efron, Jarman *et al.*, 1997; Lambert e Hartsough, 1998; Greenhill, Swanson *et al.*, 2001; Wigal, Greenhill *et al.*, 2006; Vitiello, 2008), os seguintes objetivos foram desenhados.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O principal objetivo da presente tese foi investigar a participação dos receptores adenosinérgicos nas características comportamentais e neuroquímicas de um modelo animal do TDAH.

### **2.2. Objetivos específicos**

O objetivo da primeira parte deste estudo foi comparar os efeitos do tratamento com cafeína, durante o período da adolescência, em ratos SHR e WKY na desatenção, hiperatividade e na aprendizagem e memória. O próximo passo foi avaliar se os perfis comportamentais desses animais estavam relacionados com alterações e/ou interações dopaminérgicas e adenosinérgicas, bem como na densidade de outras proteínas pré-sinápticas (p.ex. receptores CB1), do EST e do CPF. Também foram comparados os níveis de receptores  $A_{2A}$  em terminais gabaérgicos e glutamatérgicos de ratos WKY e SHR, tratados ou não com cafeína.

Após identificar as diferenças entre as linhagens WKY e SHR, os efeitos da cafeína e de um agonista canabinóide no comportamento impulsivo dos ratos SHR foram avaliados em um teste baseado na tolerância ao atraso da recompensa.

Por último, a participação dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  no comportamento relacionado ao abuso de canabinóides foi investigada em animais SHR utilizando o teste da preferência condicionada ao lugar.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Conforme mencionado na Introdução, os ratos da linhagem SHR representam um modelo apropriado para o estudo do TDAH. Uma parte dos resultados expostos neste documento (item 4.1. – 4.13.) foi obtida em experimentos realizados no Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra/Portugal utilizando ratos machos das linhagens WKY e SHR, sub-linhagens WKY/NlcoCrl e SHR/Nlcr1, comprados do Laboratório Charles River, Alemanha. Os experimentos foram desenhados para reduzir ao máximo o número de animais utilizados. Nesse sentido, os mesmos animais avaliados nos testes comportamentais foram utilizados para as análises neuroquímicas. Ao total foram adquiridos 16 ratos WKY e 16 ratos SHR para esta etapa.

Os demais resultados (item 4.14. – 4.19.) foram obtidos em experimentos realizados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) utilizando ratos machos da linhagem SHR originária da Universidade de Harvard (Boston, MA) sendo obtida a partir da UNESP (Botucatu, SP, Brasil) em 1999. A partir daí, os ratos SHR foram mantidos no laboratório de Genética do Comportamento da UFSC (Florianópolis, SC, Brasil) sob um sistema de acasalamento irmão/irmã como recomendado para todas as linhagens consangüíneas (Ilar, 1992). Para realização desta parte experimental as colônias de ratos SHR foram criadas e mantidas em nosso laboratório. A linhagem SHR, considerada como isogênica uma vez que os animais apresentam uma alta homologia de DNA entre seus indivíduos, foi comparada com ratos Wistar, considerada uma população “normal” por ser geneticamente heterogênica. A linhagem Wistar é originária da EPM/UNIFESP (São Paulo, SP, Brasil), sendo criada e mantida no biotério central da UFSC desde 1991.

Os animais foram desmamados e separados por sexo com quatro semanas de idade e, em seguida, foram agrupados em cinco ou seis em gaiolas plásticas (40 x 32 x 17 cm), tendo livre acesso à água e à comida. Os ratos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (fase clara 07h00min-19h00min). Todos os procedimentos usados no presente estudo estão de acordo com as normas de conduta com animais experimentais da União Européia e do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC, protocolos: PP00020 e PP00455)

### 3.2. Drogas e Tratamento

Diante do intenso desenvolvimento que ocorre nos sistemas neurais durante a adolescência e suas implicações com o TDAH, em parte deste estudo o tratamento com cafeína (antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, Sigma) abrangeu os 21 dias que correspondem à fase da adolescência em ratos (Spear, 2000). A cafeína foi dissolvida em salina (NaCl 0,9%) e administrada sistemicamente na dose de 2 mg/kg duas vezes ao dia, com o intervalo de 12 horas (07h00min e 19h00min), por injeções intraperitoneais (i.p.) aplicadas de maneira alternada em cada lado do peritônio. Os animais tinham 24 dias de idade (período pós-natal, PN24) no início do tratamento e 24 horas após a última administração, com 46 dias de idade (PN46), os animais foram submetidos aos testes comportamentais antes de serem sacrificados (PN53) para as análises neuroquímicas e funcionais.

Na outra etapa do estudo, experimentos que investigaram aspectos reforçadores ou impulsivos, o esquema de tratamento está descrito nos itens 3.3.4. e 3.3.5., respectivamente. Nestes experimentos, as seguintes drogas foram utilizadas: o agonista canabinóide seletivo para os receptores CB<sub>1</sub> WIN 55,212-2, [R-(+)-(2,3-dihidro-5-metil-3-[[4-morfolinil]metil]pirol[1,2,3-de]-1,4-benzoxazina-6-il)(1-naftalenil)metanona mesilato] (Tocris, USA), nas doses de 0,125; 0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg (i.p.); o antagonista canabinóide seletivo para os receptores CB<sub>1</sub> AM251, N-(Piperidina-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenol)-4-metil-1H-pirazola-3-carbox-amida (Tocris, USA), na dose de 0,25 mg/kg (i.p.); o antagonista não seletivo dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>, cafeína, nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg (i.p.); o antagonista adenosinérgico seletivo para os receptores A<sub>1</sub> DPCPX, 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (Tocris, USA), na dose de 2 mg/kg (i.p.); o antagonista adenosinérgico seletivo para os receptores A<sub>2A</sub> ZM241385, fenol-4-(2-[7-Amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazol[2,3-a][1,3,5]triazina-5-ilamino]etil), (Tocris, USA), nas doses de 0,25 e 2 mg/kg (i.p.) e o agonista dopaminérgico seletivo para os receptores D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> quinpirole, hidrocloreto quinolínic (4aR-trans)-4,4a,5,6,7,8,8a,9-Octahydro-5-propyl-1H-pirazolo[3,4-g] (Tocris, USA), nas doses de 0,25 e 1 mg/kg (subcutâneo, s.c.).

Devido a característica lipofílica dos ligantes canabinóides, o WIN e o AM251 foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%) com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) mais 0,1% de Tween 80. A solução controle consistiu do veículo utilizado para dissolver essas drogas.

Todas as doses foram selecionadas a partir de experimentos pilotos e com base em trabalhos prévios (Gevaerd, Takahashi *et al.*, 2001; Prediger, Batista *et al.*, 2005; Prediger, Da Cunha *et al.*, 2005; Pandolfo, Pamplona *et al.*, 2007; Pandolfo, Vendruscolo *et al.*, 2009; Pires, Pamplona *et al.*, 2009; Pires, Pamplona *et al.* 2010) e foram administradas no volume de 2 ml/kg de peso corporal.

### **3.3. Medidas comportamentais**

#### ***3.3.1. Atenção e flexibilidade comportamental***

O protocolo utilizado para investigar os efeitos da cafeína sobre a capacidade dos animais em manter a atenção (teste chamado de *attentional set-shifting*) foi realizado conforme descrição prévia (Floresco, Ghods-Sharifi *et al.*, 2006). Para a execução desta tarefa os animais foram alojados individualmente e submetidos à restrição alimentar, com o peso dos animais mantido em aproximadamente 80% da dieta livre. O teste foi realizado em um labirinto de quatro braços feito de madeira revestida com fórmica; cada braço media 60 cm de comprimento e 10 cm de largura, cercado por paredes de 20 cm de altura. Os quatro braços estavam conectados por uma plataforma central (10 x 13,5 cm) que dava livre acesso a todos os braços. A sala de experimentação onde estava o labirinto possuía pelo menos 1 dica visual em cada parede: porta, janela, círculo (1 m de diâmetro) e duas linhas pretas (1 m de comprimento cada). Uma lâmina de acrílico na cor branca, colocada de maneira aleatória no assoalho de cada braço, foi utilizada como dica visual. No dia que precedeu o início do teste, os animais receberam, em suas caixas moradia, cerca de 10 grânulos de ração para cães (*Royal Canin®*) para conhecerem o gosto da recompensa.

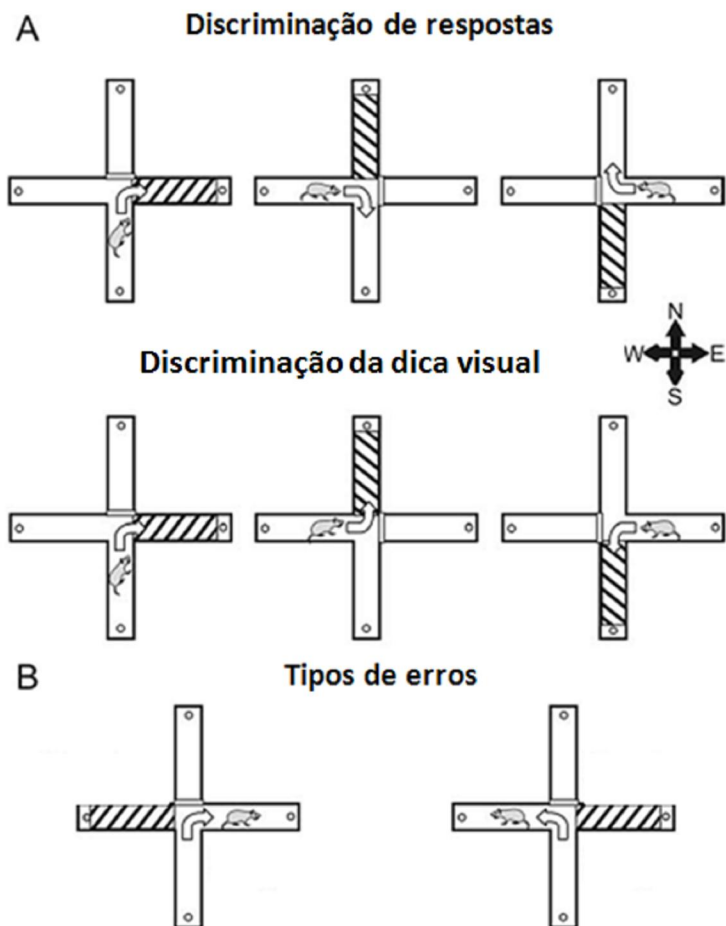
No primeiro dia de familiarização ao labirinto, três grânulos de comida foram colocados ao longo de cada um dos braços e, em seguida, os animais foram colocados na plataforma central para livre exploração dos quatro braços durante um tempo máximo de 15 min ou até comerem todos os grânulos. O critério de familiarização foi definido pelo consumo de todos os grânulos em menos de 10 min, o animal que não atingiu tal critério em menos de quatro dias foi excluído do teste. O procedimento de familiarização foi realizado para os animais se habituarem à manipulação repetida após o consumo da recompensa. Após todos os animais alcançarem o critério de familiarização, o labirinto foi conformado em “T” com a finalidade de que cada animal pudesse virar à esquerda ou à direita para obter a recompensa. Em

seguida, cada animal foi exposto repetidamente ao labirinto para consumir a recompensa e um “viés de escolha” foi definido quando o número de escolhas para o mesmo lado foi maior do que quatro vezes seguidas. Então, nos dois dias seguintes, os animais foram avaliados em duas diferentes fases: discriminação de respostas (dia 1) e discriminação da dica visual (dia 2).

Na fase da discriminação de respostas, a recompensa foi colocada apenas no braço oposto ao do “viés de escolha”, independentemente da dica visual no assoalho. Em cada exposição, o animal partiu de um dos braços designados como sul, leste e oeste para desencorajá-lo a usar dicas espaciais da sala de experimentação para localizar a recompensa (Figura 12A, painel superior). Cada rato continuou a receber exposições consecutivas, intervalo de 20 s, até atingir um critério de dez escolhas consecutivas bem sucedidas, mais uma “prova real” que consistiu em colocar o animal em uma posição desconhecida (braço norte) com a dica na direção oposta ao “viés de escolha”. Quando o animal escolheu a direção correta, a fase da discriminação de respostas termina com sucesso, caso contrário, o procedimento recomeça com um critério de cinco escolhas bem sucedidas.

Vinte e quatro horas depois, na fase de discriminação da dica visual, os ratos foram treinados a entrar no braço contendo a dica visual, com localização aleatória (Figura 12A, painel inferior). Neste caso, o critério de tarefa aprendida foi o mesmo da fase da discriminação de respostas, ou seja, acertar dez escolhas consecutivas. Até o animal terminar esta fase, três tipos de erros podem ser cometidos: perseverantes, regressivos e nunca-reforçados (Figura 12B). Os erros perseverantes foram registrados quando o rato continuava fazendo a mesma estratégia egocêntrica da fase de discriminação de respostas. Depois que cada rato fez menos de três erros perseverantes em uma série de cinco exposições, ou seja, o animal acertou três escolhas seguidas (dando indícios de uma mudança de estratégia), os erros subsequentes foram considerados regressivos (ver Figura 12B, esquerda). O último tipo de erro, dito nunca-reforçado, ocorre quando o animal faz uma escolha mal sucedida pelo lado oposto ao da estratégia egocêntrica da fase de discriminação de respostas (Figura 12B, direita). Logo, os erros regressivos e nunca-reforçados fornecem um índice da capacidade dos animais em manter a atenção e os erros perseverantes, um índice de flexibilidade comportamental.





**Perseverantes:** no início da seqüência de escolhas

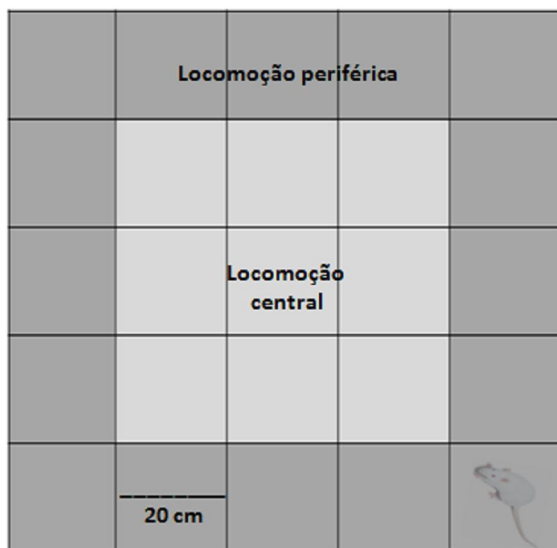
**Regressivos:** após  $\leq 50\%$  de erros perseverantes

**Nunca-reforçado**

**Figura 12.** Esquema da tarefa que avalia a atenção e a flexibilidade comportamental. As setas no labirinto da figura A representam a trajetória correta para obter a recompensa. A fase da discriminação de respostas no dia 1 (Figura A, painel superior), neste exemplo, o animal foi colocado nos braços sul (S), leste (E) e oeste (W) e precisou virar 90° a direita para obter a recompensa. Uma dica visual branca foi colocada aleatoriamente em um dos braços a cada exposição, mas não predizia a localização da comida. No dia 2, o animal foi colocado em um dos braços e, para conseguir a recompensa, precisou entrar no braço com a dica visual. Assim, o animal precisou modificar a estratégia antiga e escolheu o braço com a dica visual, previamente irrelevante, para obter a recompensa. A figura B exemplifica os três tipos de erros que os animais podem cometer.

### 3.3.2. Atividade motora e emocionalidade

O teste do campo aberto (CA) consiste de uma arena contendo uma área central aversiva e representa um modelo amplamente utilizado para a avaliação tanto da atividade motora como de comportamentos relacionados à ansiedade (Prut e Belzung, 2003). O aparelho feito de madeira com assoalho preto foi dividido por linhas brancas em 25 quadrados (20 x 20 cm) e cercado por paredes elevadas em 40 cm de altura. Cada rato foi colocado no centro do CA e as seguintes variáveis foram registradas por 10 minutos: número de quadrados periféricos (adjacentes às paredes) cruzados (locomoção periférica), número de quadrados centrais (longe das paredes) cruzados (locomoção central), porcentagem de locomoção central em relação à locomoção total (locomoção periférica mais locomoção central). Um cruzamento foi registrado quando o animal atravessou o quadrado com as quatro patas (Figura 13).

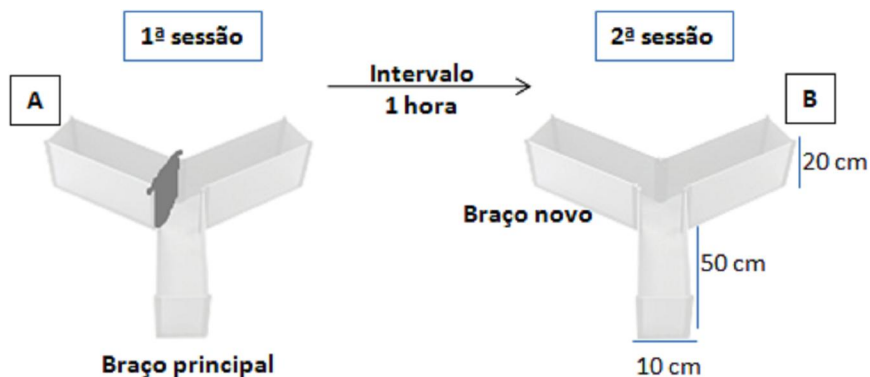


**Figura 13.** Representação do aparelho utilizado no teste do campo aberto.

### 3.3.3. Memória espacial

A memória de reconhecimento espacial dos animais foi investigada usando um labirinto em “Y” (Dellu, Mayo *et al.*, 1992). O aparelho feito de acrílico preto possuía três braços iguais (50 x 10 x 20

cm, cada braço) afastados em  $120^\circ$  e foi colocado em uma sala com dicas visuais nas paredes para facilitar a localização espacial dos animais. O protocolo consistiu de duas sessões separadas por um intervalo de 1 hora. Na primeira sessão, o animal foi colocado no final de um dos braços, chamado de braço principal, e teve livre acesso para explorar o outro braço durante 5 min. O terceiro braço estava bloqueado por uma porta guilhotina (Figura 14A) e foi chamado de braço novo. O rato foi então removido do labirinto e retornou a caixa moradia. Depois de uma hora, na segunda sessão, o animal foi novamente colocado no braço principal do labirinto para explorar livremente todos os três braços durante 5 min (Figura 14B). O número de entradas e o tempo de permanência em cada braço foram registrados. Os resultados estão expressos pelo percentual de entradas e de tempo gasto no braço novo.



**Figura 14.** Ilustração do protocolo utilizado no teste do labirinto em ‘Y’.

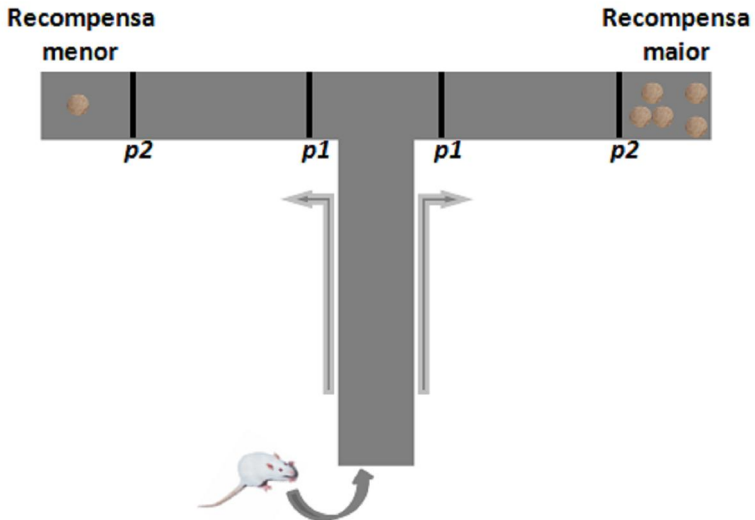
### ***3.3.4. Impulsividade***

O comportamento impulsivo dos ratos SHR foi investigado com o paradigma da tolerância ao atraso da recompensa, que se baseia na preferência entre recompensas “menores e imediatas” ou “maiores e demoradas”, conforme protocolo previamente descrito (Thiebot, Le Bihan *et al.*, 1985; Bizot, Thiebot *et al.*, 1988). Para tal, os animais foram submetidos à restrição alimentar durante 1 semana. Os experimentos foram realizados em um labirinto em ‘T’ feito de madeira revestida com fórmica impermeável da cor preta e elevado 52 cm do chão. Cada braço media 50 cm de comprimento e 10 cm de largura,

cercados por paredes de 40 cm de altura. Um dos braços do labirinto foi utilizado como ponto de partida para cada animal, os outros dois braços permitiam o animal virar à esquerda ou à direita para conseguir a recompensa. Estes braços eram providos com portas guilhotinas que poderiam ser inseridas em fendas situadas na entrada ( $p1$ ) e no final de cada braço ( $p2$ ). No final de um dos braços, eleito aleatoriamente para cada animal, foi colocada a recompensa maior (aproximadamente 500mg de ração) e no braço oposto a recompensa menor (aproximadamente 100mg) (Figura 15). O protocolo experimental foi dividido em quatro fases: familiarização, pré-treinamento, treinamento e teste. Na fase de familiarização, cada animal explorou o labirinto duas vezes, com intervalo de 2 h entre as explorações, durante 5 min. e todas as portas guilhotinas ficaram abertas, possibilitando a obtenção da recompensa em ambos os braços.

Na fase de pré-treinamento, o animal foi colocado no labirinto com portas  $p2$  fechadas e quando ele escolheu um dos braços a porta  $p1$  foi fechada e a porta  $p2$  foi aberta, revelando a recompensa. O animal foi removido do aparelho após ter consumido completamente a recompensa e retornou a sua caixa moradia para um intervalo de 2-3 min. Esse procedimento foi repetido cinco vezes e, após o intervalo de uma hora, os animais foram submetidos a mais uma sessão com cinco exposições. Essas duas sessões, com cinco exposições cada, foram executadas durante seis dias. No último dia, cada animal apresentou mais de 80% de preferência pelo braço com a recompensa maior.

A fase de treinamento consistiu de cinco exposições diárias por cinco dias. Quando o animal escolheu o braço da recompensa maior, a porta  $p1$  foi fechada, confinando-o entre as portas  $p1$  e  $p2$ , onde permaneceu durante 15 segundos antes ter acesso a recompensa. Por outro lado, quando a escolha do animal foi pelo braço com recompensa menor não houve qualquer atraso na entrega da comida. No final desta fase, os traços impulsivos dos animais SHR já foram claramente observados: a preferência pelo braço com a recompensa maior caiu de 80% para aproximadamente 20%.



**Figura 15.** Ilustração esquemática do labirinto em “T” usado no teste da tolerância ao atraso da recompensa.

A fase de teste consistiu de cinco sessões diárias durante seis dias. Todos os animais foram injetados i.p. com solução controle (NaCl 0,9%, DMSO 10%, Tween80 0,1%), nos dois primeiros dias (controle pré-tratamento), 30 min. antes de serem submetidos ao labirinto. Nos próximos dois dias (tratamento), os animais foram divididos em cinco grupos: cafeína 2 m/kg; cafeína 5 m/kg; WIN 0,125 mg/kg; WIN 0,25 mg/kg e AM251 0,25 mg/kg. Grupos independentes de animais foram pré-tratados com cafeína (2 mg/kg, i.p.) ou AM251 (0,25 mg/kg, i.p.) 20 min antes do tratamento com WIN (0,25 mg/kg, i.p.), o qual induziu aumento no comportamento de impulsividade neste teste. Nos últimos dois dias desta fase (controle pós-tratamento) os animais receberam solução controle e foram, após 30 min., submetidos ao aparelho com o intuito de investigar um possível efeito residual ou prolongado de cada droga.

### ***3.3.5. Propriedades reforçadoras e aversivas***

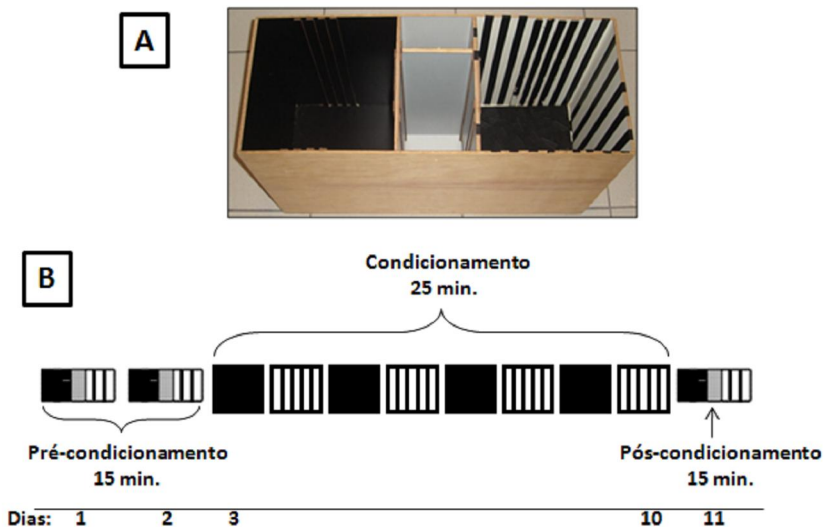
A preferência condicionada ao lugar (PCL) é um modelo amplamente utilizado para mensurar os efeitos reforçadores ou aversivos de drogas comumente abusadas por humanos. O paradigma está baseado na capacidade do animal em associar o efeito de uma determinada droga a pistas contidas em um ambiente, como em um condicionamento

pavloviano clássico (Tzschentke, 2007). A preferência ou aversão ao lugar foi avaliada em caixas feitas de madeira e revestidas com fórmica. Cada caixa possuía três diferentes compartimentos separados por portas guilhotinas. Os dois compartimentos de condicionamento (30 x 25 x 40 cm) tinham distintas dicas visuais e táteis: um compartimento era preto com o assoalho de madeira e o outro era branco com listras verticais pretas e assoalho metálico. O compartimento “neutro” (15 x 25 x 40 cm) era cinza com assoalho de madeira e dava acesso aos outros dois compartimentos de condicionamento (Figura 16A). O protocolo utilizado é conhecido como sem viés (do inglês, *unbiased conditioned place preference*) onde as condições experimentais são selecionadas para resultar em uma preferência balanceada dos animais para ambos os compartimentos antes do condicionamento. Neste sentido, os animais que permaneceram acima de 85% em um determinado compartimento foram excluídos do experimento. O comportamento de cada animal foi registrado via uma câmera de vídeo posicionada acima das caixas e monitorado em uma sala adjacente.

O protocolo foi executado em 11 dias (Figura 16B), divididos em três fases: pré-condicionamento, condicionamento e pós-condicionamento. Na fase de pré-condicionamento (os dois primeiros dias), os ratos exploraram livremente os três compartimentos durante 15 min. por dia e o tempo gasto no segundo dia em cada um dos três compartimentos foi registrado.

A fase de condicionamento consistiu de oito sessões, uma por dia. Divididos em grupos independentes, cada animal foi injetado i.p. com WIN (0,125; 0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg), AM251 (0,25 mg/kg), cafeína (2 ou 5 mg/kg), ou ZM241385 (0,5 ou 2 mg/kg), DPCPX (2 mg/kg) ou quinpirole (0,25 ou 1 mg/kg) e, imediatamente após, confinado em um dos dois compartimentos por 25 min. Em dias alternados, os ratos receberam veículo (NaCl 0,9%, DMSO 10%, Tween 80 0,1%) e foram confinados no compartimento oposto. Os animais do grupo controle receberam veículo em ambos os compartimentos.

Na fase de pós-condicionamento, cada animal foi colocado no compartimento neutro, as portas que davam acesso aos dois compartimentos de condicionamento estavam abertas, e o tempo de permanência no compartimento condicionado com a droga foi registrado por 15 min. Os níveis de preferência ou aversão ao lugar foram definidos pela comparação do tempo gasto no compartimento de condicionamento com a droga antes e depois do condicionamento (pré e pós-condicionamento, respectivamente).



**Figura 16.** Foto da caixa utilizada no teste da PCL (A) e a representação esquemática das três fases (pré-condicionamento, condicionamento e pós-condicionamento) do protocolo (B).

Experimentos adicionais, repetidos com o mesmo protocolo, foram realizados para a associação do tratamento com cafeína (2 ou 5 mg/kg), DPCPX (2 mg/kg), ZM241385 (2 mg/kg) ou AM 251 (0,25 mg/kg) com a dose de 0,25 mg/kg de WIN. O pré-tratamento foi feito 20 min antes do tratamento.

Para investigar os efeitos do tratamento crônico com cafeína nas propriedades reforçadoras do WIN em ratos SHR, dois grupos de animais foram tratados durante a adolescência com cafeína (2 mg/kg, i.p., intervalo de 12h entre cada administração) ou salina. Após o tratamento, na idade adulta, os animais foram submetidos ao esquema da PCL, cada grupo foi subdividido em dois, para o tratamento com WIN ou veículo, resultando em quatro diferentes grupos: salina-salina; salina-WIN; cafeína-salina e cafeína-WIN.

### 3.4. Preparação de sinaptossomas

Os sinaptossomas são formados a partir de terminais nervosos, separados de seus axônios e de partes das conexões pós-sinápticas, através de consecutivas centrifugações, de modo que as membranas dos

terminais nervosos se fecham para formar uma vesícula contendo organelas como as encontradas nos botões sinápticos. Esta preparação tem sido habitualmente utilizada para estudar a transmissão sináptica, uma vez que os sinaptossomas possuem organelas celulares necessárias para captar, armazenar e liberar neurotransmissores (Dunkley, Jarvie *et al.*, 2008).

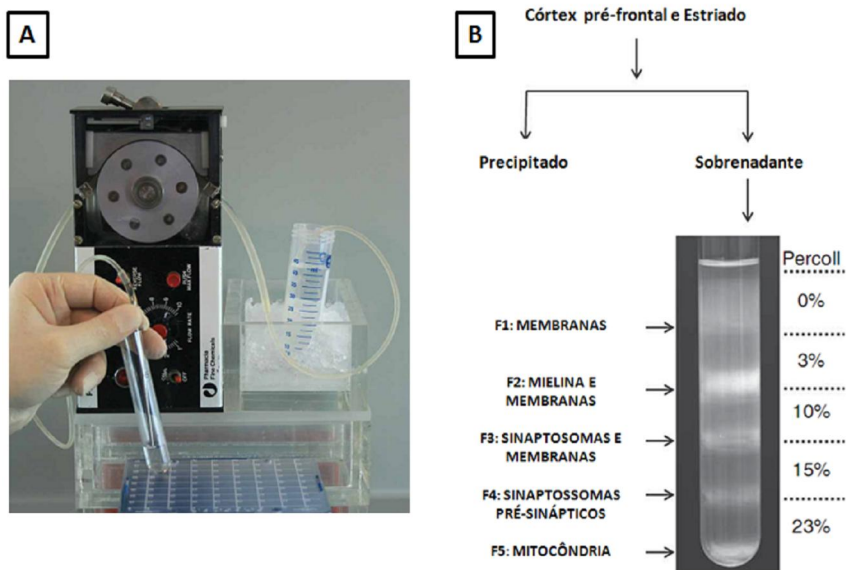
Os mesmos grupos de animais experimentados nos procedimentos de atenção, locomoção e memória espacial foram utilizados para as análises neuroquímicas. Vinte e quatro horas após o último teste comportamental, os animais foram profundamente anestesiados sob uma atmosfera de halotano antes de serem sacrificados por decapitação. Então, o córtex pré-frontal (CPF) e o estriado (EST) dos animais foram rapidamente dissecados sobre uma placa de Petri apoiada em gelo picado, em menos de 3 min. Após a dissecação, cada estrutura foi homogeneizada separadamente para a preparação dos sinaptossomas.

Foram utilizados dois métodos para a preparação dos sinaptossomas, o primeiro método resulta em um tipo de sinaptossoma contendo predominantemente terminais pré-sinápticos (terminais nervosos purificados) e outro tipo contendo material da pré, pós-sinapse e células da glia (sinaptossomas não purificados). Os terminais nervosos purificados foram preparados conforme descrito por Dunkley *et al.* (2008) e serviram para investigar os níveis e a co-localização de diferentes proteínas pré-sinápticas. Nos estudos de captação, o método mais rápido de obtenção de sinaptossomas (não purificados) foi utilizado para manter uma boa viabilidade funcional (3-4h) durante os ensaios. Este tipo de sinaptossomas também foi utilizado para os experimentos com a técnica de *Western blot* e foi preparado conforme descrito por Canas *et al.* (2009).

Para a obtenção de terminais nervosos purificados, os sinaptossomas foram isolados usando um gradiente descontínuo de Percoll. O CPF ou o EST de cada animal foi homogeneizado em 10 ml da solução: sacarose 0,25 M; HEPES 10 mM; pH 7,4. O homogenato foi mantido a 4°C e centrifugado a 3000x *g* durante 10 min, então o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 14000x *g* durante 12 min. Em seguida, o precipitado foi re-suspendido em 2 ml de sacarose 0,25 M e HEPES 10 mM e foi colocado em tudo de ensaio contendo 5 diferentes fases de Percoll: 0, 3, 10, 15 e 23%. Este gradiente foi criado com a ajuda de uma bomba peristáltica que permitiu a sobreposição das diferentes camadas de Percoll (Figura 17A). O tubo de ensaio contendo



a amostra e o gradiente de Percoll foi centrifugado a  $25000\times g$  por 11 min a  $4^{\circ}\text{C}$  sem desaceleração. Os sinaptossomas foram coletados entre as fases 15 e 23% de Percoll (Figura 17B) e diluídos em 15 ml de HEPES tamponado (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM glicose e 10 mM HEPES) para outra centrifugação a  $22000\times g$  por 11 min. A fração sinaptossomal foi o precipitado resultante desta centrifugação. Para obter um material predominantemente pré-sináptico, os procedimentos precisam ser feitos com soluções sem cálcio e com o pH rigorosamente ajustado a 7,4.



**Figura 17.** (A) Foto de uma bomba peristáltica utilizada para preparação do gradiente de Percoll. (B) As cinco diferentes fases de Percoll (0, 3, 10, 15 e 23%) e o tipo de material presente em cada interfase. Adaptado de Dunkley et al. 2008.

O método de preparação de sinaptossomas não purificados utilizou apenas 1 concentração de Percoll: 45% v/v. Cada estrutura foi homogeneizada a  $4^{\circ}\text{C}$  em solução de sacarose (0,32 M) contendo 1 mM de EDTA, 10 mM de HEPES, albumina sérica bovina (BSA) 1 mg/ml pH 7,4, e centrifugados a  $3000\times g$  durante 10 min, então o sobrenadante foi coletado e centrifugado a  $14000\times g$  durante 12 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o precipitado foi re-suspendido em 1 ml de uma solução de Percoll 45% preparado em uma solução de Krebs (composição de 140

mM NaCl, 5 mM de KCl, 25 mM de HEPES, 1 mM de EDTA, 10 mM de glicose, pH 7,4). Depois da centrifugação a 14000x *g* durante 2 min a 4°C, a camada superficial, enriquecida com sinaptossomas, foi removida lavada em 1 ml de solução de Krebs e re-suspensa em Krebs-HEPES (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 Mm HEPES, 5 mM glucose, pH 7.4).

### **3.5. Medidas neuroquímicas**

#### *3.5.1. Imunocitoquímica*

Os terminais nervosos purificados foram colocados em lâminulas cobertas com poli-D-lisina (Sigma, Portugal) e fixados com paraformaldeído 4% durante 15 min. Os sinaptossomas foram permeabilizados em PBS com 0,2% de Triton X-100 por 10 min. e então bloqueados durante 1 hora com PBS contendo 3% de albumina sérica bovina (BSA) e 5% de soro bovino normal. Os sinaptossomas foram então lavados duas vezes com PBS e incubados com anticorpos primários, ver Tabela 3. Em seguida, os sinaptossomas foram lavados três vezes com PBS contendo 3% de BSA e incubados por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpos secundários marcados com um fluoróforo (Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 594, diluição 1:200, Invitrogen). Depois das lâminas montadas com meio Prolong Antifade (Molecular Probes, Leiden, Holanda), as preparações foram visualizadas em um microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 200 com o programa Axiovision 4.6 (PG-Hitec, Lisboa, Portugal). Cada lâminula, duas ou três por experimento, foi analisada pela contagem de três ou quatro diferentes campos com um mínimo de 500 elementos individualizados.

**Tabela 3.** Anticorpos primários usados na imunocitoquímica.

<b>Anticorpo</b>	<b>Empresa</b>	<b>Tipo</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>
Sinaptofisina	Sigma	Monoclonal	Camundongo	1:200
			Coelho	1:200
SNAP-25	Sigma	Monoclonal	Coelho	1:200
PSD-95	Sigma	Monoclonal	Camundongo	1:200
GFAP	Sigma	Monoclonal	Coelho	1:400
DAT	Chemicon	Monoclonal	Coelho	1:200
	Santa Cruz	Policlonal	Camundongo	1:200
A <sub>2A</sub>	Santa Cruz	Policlonal	Camundongo	1:200
	Millipore	Monoclonal	Cobaia	1:500
VGlut-1	Millipore	Policlonal	Cobaia	1:1000
VGAT	Calbiochem	Policlonal	Cobaia	1:1000

Os controles para a verificação de que os sinaptossomas aqui utilizados eram predominantemente pré-sinápticos, bem como a seletividade dos anticorpos secundários, estão expressos no Anexo I (Figura I e Tabela I, respectivamente).

### *3.5.2. Western blot*

Os sinaptossomas foram solubilizados em dodecil sulfato de sódio 5% (SDS – Bio-Rad, Portugal) contendo 2 mM de DTT e 100 µM de fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) e então sonicados rapidamente. Após a mensuração da quantidade de proteínas usando o método do ácido bicinonínico (Pierce, Dagma, Portugal), 1/6 volume do tampão de amostra SDS-PAGE foi adicionado antes da armazenagem a -80°C. A eletroforese foi feita usando um gel SDS-PAGE 7,5% (Tabela 4).

**Tabela 4.** Preparação do gel de entrada e de corrida para o Western blot

<b>Preparação do gel</b>	<b>4%</b>	<b>7,5%</b>
Tampão Tris; 0,5 M; pH 6,8 (gel de entrada)	2,5 ml	--
Tampão Tris; 1,5 M; pH 8,8 (gel de corrida)	--	3,02 ml
Acrilamina 30% (Bio-Rad)	1,3 ml	2,25 ml
Água	6,1 ml	3,45 ml
SDS 10% (Sigma-Aldrich, Portugal)	100 µl	195 µl
TEMED (Sigma-Aldrich, Portugal)	10 µl	6 µl
APS 10% (Sigma-Aldrich, Portugal)	50 µl	50 µl

As proteínas foram então transferidas para membranas de polivinilideno difluorídico (PVDF) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). As membranas foram bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente com BSA 3%, pH 7,6; contendo 0,1% de Tween20 (TBS-T). As membranas foram incubadas durante 12 h a 4°C com o anticorpo primário (Tabela 5) e depois lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário durante 1 h. Após lavar com TBS-T, as membranas foram reveladas com um kit de fluorescência (ECF, GE Healthcare Buckinghamshire, UK) e visualizadas em um VersaDoc 3000 (Bio-Rad, Portugal).

**Tabela 5.** Lista de anticorpos primários usados no Western blot

<b>Anticorpo</b>	<b>Empresa</b>	<b>Tipo</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>	<b>P.M. (kda)</b>
SNAP-25	Sigma	Monoclonal	Camundongo	1:20000	~25
Sinaptofisina	Sigma	Monoclonal	Camundongo	1:20000	~38
D1	Doação*	Monoclonal	Cabra	1:500	~49
D2	Doação*	Monoclonal	Coelho	1:500	48-51
DAT	Chemicon	Monoclonal	Camundongo	1:1000	43-55
TH	Chemicon	Monoclonal	Camundongo	1:1000	56-60
A2A	Chemicon	Monoclonal	Camundongo	1:1000	~43
CB1	Proteimax	Policlonal	Coelho	1:1000	~50
-tubulina	Sigma	Monoclonal	Camundongo	1:20000	~55

\*Gentilmente fornecido por Takahashi, L.M.

Os anticorpos foram removidos das membranas para marcação com a  $\alpha$ -tubulina (controle de carregamento). Para isso, o ECF foi retirado com metanol 40% durante 20-30 min. à temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi então lavada com água. A membrana foi submergida em uma solução de glicina 0,2M (75,07g/mol; + 1 g de SDS + 10 ml Tween para 1 L; pH 2,2) durante 40min à temperatura ambiente e sob agitação. Após ser lavada 2x em TBS-Tween (0,1%) por 5 min, a membrana foi bloqueada BSA e, em seguida, incubada com o anticorpo primário contra  $\alpha$ -tubulina.

### ***3.5.3. Captação de dopamina***

No ensaio de captação de [ $^3$ H]DA, os sinaptossomas foram diluídos em uma solução contendo (134 mM de NaCl; 4,8 mM de KCl; 1,3 mM de CaCl<sub>2</sub>; 1,4 mM de MgSO<sub>4</sub>; 3,3 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 12,7 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O; 10 mM de glicose; 1 mM de ascorbato; 1  $\mu$ M de pargilina). Uma alíquota de 100  $\mu$ L de sinaptossoma, aproximadamente 500 $\mu$ g de proteína, foi aquecida a 37°C por 10 min.

A captação de dopamina radioativa foi iniciada pela adição de 50  $\mu$ l de solução contendo 1  $\mu$ Ci/mL de [ $^3$ H]DA por 3 min. a 37 °C. Em seguida, as amostras foram rapidamente filtradas a vácuo, e após sucessivas lavagens, os filtros foram deixados para secar a temperatura ambiente. Após adicionar 3 ml de líquido de cintilação, o conteúdo de [ $^3$ H] captado pelos sinaptossomas foi lido por 2 min. em um contador (Tricarb  $\beta$ -counter – PerkinElmer) e o número de desintegrações por min foi expresso pela porcentagem em relação ao grupo controle (WKY-Controle), separadamente para cada área cerebral (EST e CPF). A captação de [ $^3$ H]DA foi calculada como a diferença entre a quantidade total de DA captada pelos sinaptossomas e o componente inespecífico da captação de [ $^3$ H]DA foi determinado na presença do inibidor dos transportadores de dopamina (GBR12783, 1 $\mu$ M). Os valores das contagens e desintegrações por minutos obtidos em terminais nervosos do EST e do CPF de ambas as linhagens estão expressos no Anexo II (Tabela II).

### **3.6. Pressão arterial**

A pressão arterial (mmHg) dos animais foi medida após o tratamento agudo com o agonista canabinóide WIN (0,125 – 2,5 mg/kg, i.p.). Sob anestesia com ketamina (90 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), injetada pela via intramuscular, um cateter heparinizado PE20 foi

inserido na artéria carótida direita para o registro da pressão arterial sistólica e diastólica. O cateter estava conectado ao transdutor de pressão (Mikro-Tip®, Millar Instruments, Inc., Houston, Texas, USA) acoplado a um sistema de aquisição Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Para prevenir a formação de coágulos e a obstrução das cânulas os animais receberam uma injeção intraperitoneal de heparina (300 UI) 10 min antes da anestesia. Os animais respiraram espontaneamente através de uma cânula traqueal e a temperatura do corpo (mantida a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) foi monitorada por um termômetro retal. Após o procedimento cirúrgico e de um período de 5 min para a estabilização da pressão arterial, e imediatamente após a administração de WIN, a pressão arterial diastólica e sistólica foi registrada por 30 min.

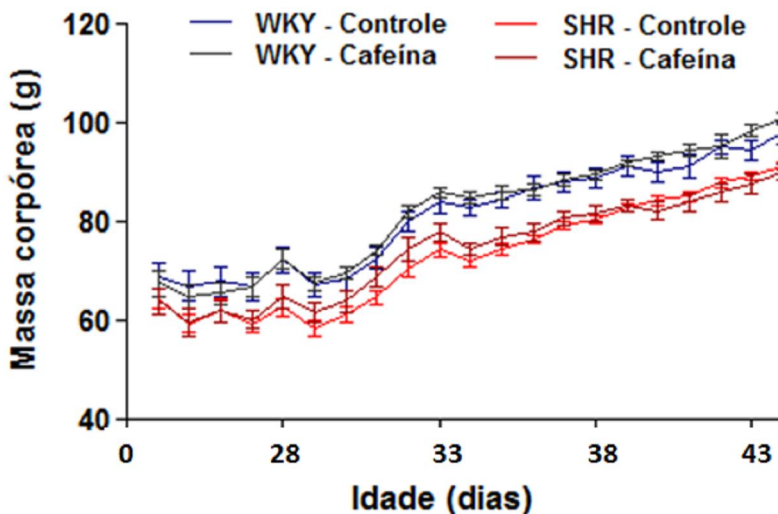
### **3.7. Análise estatística**

Todos os valores estão expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). As comparações estatísticas em todas as medidas neuroquímicas, nos parâmetros do campo aberto, do teste de atenção e do labirinto em “Y” foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, com linhagem e tratamento como variáveis independentes. Os dados do teste da preferência condicionada ao lugar e da tolerância ao atraso da recompensa, realizados somente em ratos SHR, foram analisados pela ANOVA de duas vias, com o fator tratamento e medida repetida como variáveis independentes. Quando significativa a ANOVA, múltiplas comparações post hoc foram feitas usando o teste de Duncan. O nível de significância adotado em todos os experimentos foi  $P < 0,05$ . Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Massa corporal de ratos WKY e SHR durante o tratamento com cafeína

Para o cumprimento da tarefa que investigou a atenção, os animais foram tratados com salina ou cafeína durante a adolescência sob restrição alimentar. No início do tratamento, os animais foram isolados com 24 dias pós-natal (PN) e, cada animal, pesando aproximadamente 65 g, recebeu 6 g de comida por dia durante 5 dias. Com 29 PN a quantidade de comida aumentou para 9 g por dia por animal até o dia 34 PN, quando a dieta passou a ser de 12 g até o fim dos experimentos (Figura 18). Conforme pode ser visualizado na Figura 18, os animais WKY possuem uma massa corporal ligeiramente maior do que os animais SHR (típico dessas linhagens) e o tratamento com cafeína não interferiu no ganho de peso em ambas as linhagens.



**Figura 18.** Massa corpórea de ratos WKY e SHR submetido à restrição alimentar durante 21 dias de tratamento com salina ou cafeína (2 mg/kg, i.p., durante 21 dias, duas vezes ao dia).

## 4.2. Atenção e flexibilidade comportamental

Os efeitos do tratamento crônico com cafeína na capacidade dos animais WKY e SHR em desempenhar uma tarefa que exigiu foco e manutenção da atenção perante a um conjunto de mudanças necessárias para obtenção da recompensa estão sumarizados na Figura 19. Para a fase de discriminação de respostas (Figura 19A), a qual exige a aprendizagem de uma simples tarefa egocêntrica, a ANOVA de duas vias revelou um efeito estatisticamente significativo da interação entre os fatores tratamento e linhagem [ $F(1,26) = 4,66$ ;  $P < 0,05$ ] para o número total de exposições ao labirinto. As comparações subsequentes indicaram que os ratos SHR do grupo controle, tratados com salina, precisaram um número maior de exposições ao labirinto para atingirem o critério de 10 escolhas corretas consecutivamente em comparação aos animais WKY. Além disso, o tratamento com cafeína melhorou o prejuízo de aprendizagem discriminativa apresentado pelos SHR, como indicado pela redução no número total de exposição ao labirinto. Por outro lado, o desempenho dos animais WKY nesta fase não foi alterado pelo tratamento com cafeína.

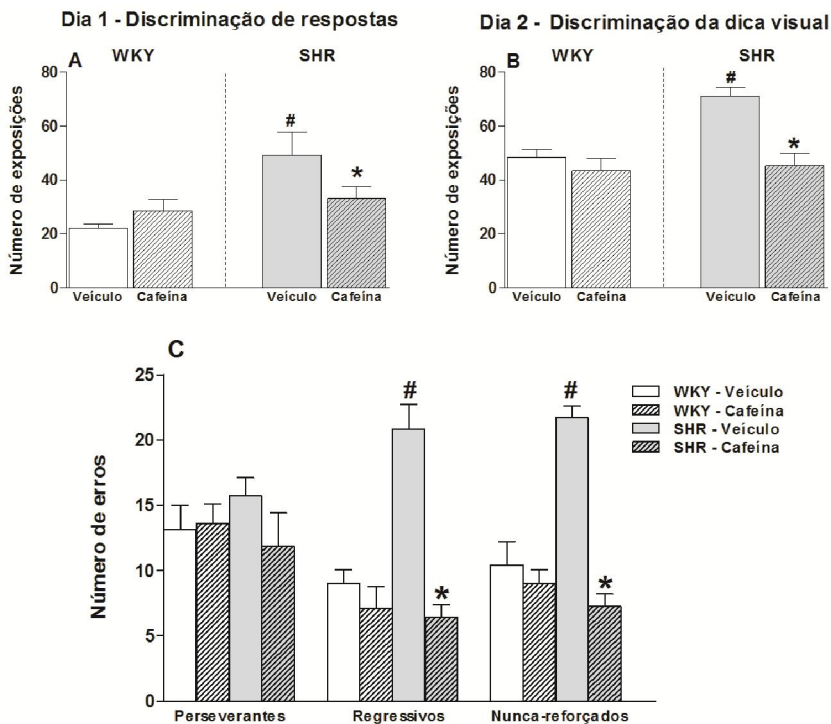
Resultados similares foram notados no dia 2, durante a fase de discriminação da dica visual, com ANOVA de duas vias indicando efeito significativo da interação entre os fatores linhagem e tratamento [ $F(1,26) = 6,24$ ;  $P < 0,05$ ] para o número total de exposições ao labirinto. Os animais SHR demandam mais exposições ao labirinto para alcançarem o critério desta fase em comparação aos animais WKY. Novamente, somente em ratos SHR, o tratamento com cafeína reduziu o número total de exposições para completar a missão (Figura 19B).

Em relação aos erros perseverantes, regressivos e nunca-reforçados, a análise estatística foi efetuada separadamente para cada tipo de erro (Figura 19C). A ANOVA revelou um efeito significativo da linhagem {[ $F(1,26) = 44,6$ ;  $P < 0,001$ ] para os erros regressivos e [ $F(1,26) = 15,88$ ;  $P < 0,001$ ] para os erros nunca-reforçados}, tratamento {[ $F(1,26) = 30,67$ ;  $P < 0,001$ ] para os erros regressivos e [ $F(1,26) = 43,58$ ;  $P < 0,001$ ] para os erros nunca-reforçados} e para a interação entre linhagem e tratamento {[ $F(1,26) = 18,18$ ;  $P < 0,001$ ] para os erros regressivos e [ $F(1,26) = 29,29$ ;  $P < 0,001$ ] para os erros nunca-reforçados} no número total de erros cometidos. Por outro lado, a análise dos erros perseverantes não revelou efeitos estatisticamente significantes para nenhum dos fatores: linhagem, tratamento e sua interação. Comparações múltiplas entre os grupos mostraram que os ratos SHR tratados com salina cometem mais erros regressivos e nunca-



reforçados do que os ratos WKY. E a análise indicou que os animais SHR tratados cronicamente com cafeína diminuíram significativamente o cometimento de erros regressivos e nunca-reforçados. Em ratos WKY, o tratamento com cafeína não afetou significativamente o desempenho na tarefa.

Em conjunto, os dados mostram que os animais SHR apresentam uma dificuldade em manter a atenção, como indicado pelo elevado número de erros regressivos e nunca-reforçados, em relação aos animais WKY, confirmando as características de desatenção modeladas pela linhagem. Os SHR também mostraram um desempenho reduzido na aquisição de uma aprendizagem discriminativa, seja pela formação de uma estratégia egocêntrica (dia 1) ou visual (dia 2). Além disso, o tratamento com cafeína melhorou os parâmetros atencionais e mnemônicos exibidos por um modelo animal do TDAH.



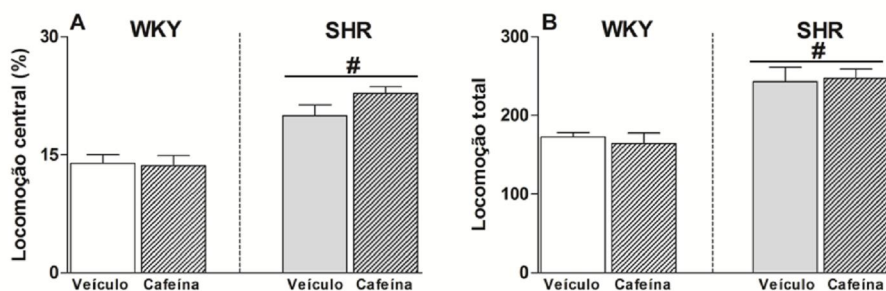
**Figura 19.** Efeitos do tratamento crônico com cafeína durante 21 dias (2 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia) em ratos WKY e SHR na atenção avaliada pelo

*attentional set-shifting*. O número total de exposições para atingir o critério das fases de (A) discriminação de respostas, (B) discriminação da dica visual e nos (C) três diferentes tipos de erros: perseverantes, regressivos e nunca-reforçados. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 6-8 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle da mesma linhagem. # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle da linhagem WKY.

### 4.3. Atividade motora e emocionalidade

O teste do campo aberto foi utilizado para confirmar a hiperatividade e o baixo perfil de ansiedade apresentados pelos ratos SHR em comparação aos WKY e uma possível influência do tratamento crônico, 21 dias, com cafeína (2mg/kg, i.p. duas vezes ao dia) em ambas as linhagens. O índice relacionado à emocionalidade está sumarizado na Figura 20A e à atividade motora na Figura 20B.

A ANOVA de duas vias, linhagem e tratamento, revelou um efeito estatisticamente significativo do fator linhagem no percentual de locomoção central [F(1,26) = 42,03;  $P < 0,001$ ] e total [F(1,26) = 34,94,  $P < 0,001$ ]. A análise não revelou efeito significativo para o tratamento ou interação entre linhagem e tratamento em nenhum dos dois parâmetros. Como esperado, as comparações múltiplas mostraram que os ratos SHR cruzam mais quadrados na área central aversiva e periférica do campo aberto em relação aos WKY. O tratamento crônico com cafeína não alterou a hiperatividade e o comportamento relacionado à emocionalidade exibidos pelos SHR.

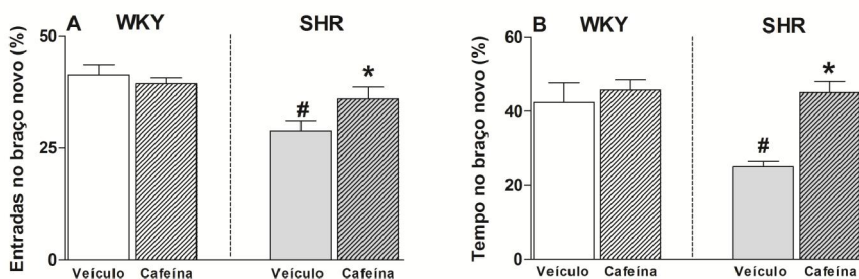


**Figura 20.** Efeitos do tratamento crônico com cafeína (2 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia durante 21 dias) na porcentagem de locomoção central (A) e locomoção total (B) de ratos WKY e SHR no teste do campo aberto durante 10 min. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 6-8 animais por grupo e foram

separadas de acordo com o tratamento e linhagem. <sup>#</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo controle da linhagem WKY.

#### 4.4. Memória espacial

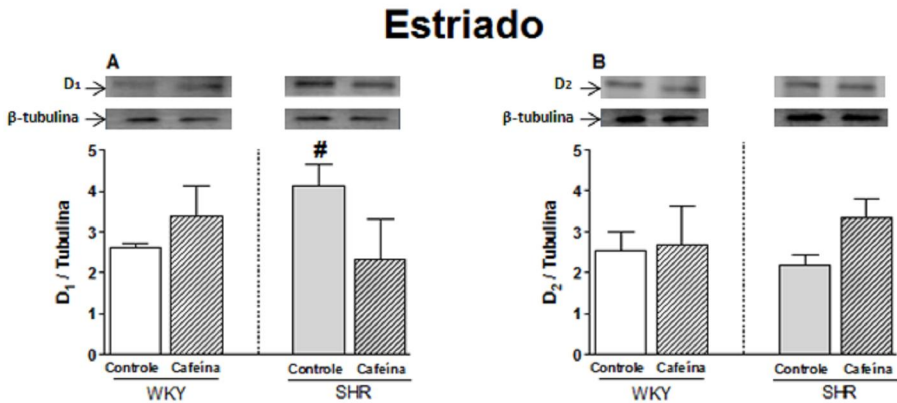
A Figura 21 ilustra os efeitos da cafeína sobre o número de entradas (A) e o tempo de permanência (B) no braço novo do labirinto em “Y”, parâmetros ligados ao reconhecimento espacial de curto prazo. Confirmando as expectativas, a análise revelou um efeito significativo para o fator linhagem no número de entradas [F(1,26) = 13,46; P<0,001; Figura 21A] e no tempo de permanência [F(1,26) = 7,04; P<0,05; Figura 21B] no braço novo. As comparações seguintes mostraram que os ratos SHR do grupo controle entram menos e permanecem menos tempo no braço novo em relação ao WKY. Além disso, ANOVA revelou um efeito significativo da interação entre linhagem e tratamento para o número de entradas [F(1,26) = 4,56; P<0,05] e tempo gasto [F(1,26) = 6,03; P<0,05] no braço novo. O teste post-hoc demonstrou que o tratamento com cafeína melhora o prejuízo de reconhecimento espacial apresentado pelos SHR uma vez que houve um aumento significativo no número de entradas e no tempo de permanência no braço novo do labirinto em “Y”. Por outro lado, os animais da linhagem WKY não apresentaram alterações significativas nesses parâmetros quando tratados com cafeína.

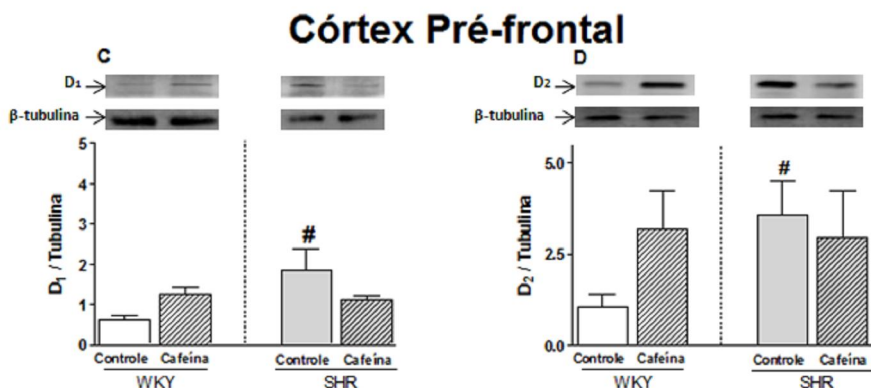


**Figura 21.** Efeitos do tratamento crônico com cafeína (2 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia durante 21 dias) em ratos WKY e SHR no número de entradas (A) e no tempo gasto (B) no braço novo do labirinto em “Y” durante 5 min da 2ª sessão. As barras representam a média ± E.P.M. de 6-8 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem. <sup>#</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo controle da linhagem WKY. <sup>\*</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo controle da mesma linhagem.

### 4.5. Receptores de dopamina, subtipos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>

O próximo passo foi verificar se o baixo desempenho cognitivo dos SHR, melhorado com o tratamento com cafeína, estava associado com alterações dopaminérgicas no EST e CPF. No EST (Figura 22, painel superior), apesar da ANOVA de duas vias ter indicado um efeito estatisticamente significativo da interação entre os fatores linhagem e tratamento [ $F(1,12) = 4,72$ ;  $P < 0,05$ ], as comparações subsequentes não revelaram efeito significativo para o tratamento com cafeína e mostraram que os sinaptossomas de ratos SHR do grupo controle apresentaram uma maior imunoreatividade de receptores D<sub>1</sub> em comparação aos controles WKY (60%  $p < 0,05$ ; Figura 22A). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes dos fatores linhagem e tratamento, ou da interação entre eles, para a imunoreatividade de receptores D<sub>2</sub> em terminais nervosos do ST (Figura 22B). No CPF (Figura 22, painel inferior), a análise indicou um efeito estatisticamente significativo da interação entre os fatores [ $F(1,11) = 5,41$ ;  $P < 0,05$ ], as comparações mostraram que, apesar da cafeína não alterar significativamente a densidade de receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> em ambas as linhagens, os SHR apresentaram maior densidade de D<sub>1</sub> (210%,  $p < 0,05$ ; Figura 22C) e D<sub>2</sub> (240%,  $p < 0,05$ ; Figura 22D) em relação aos WKY.



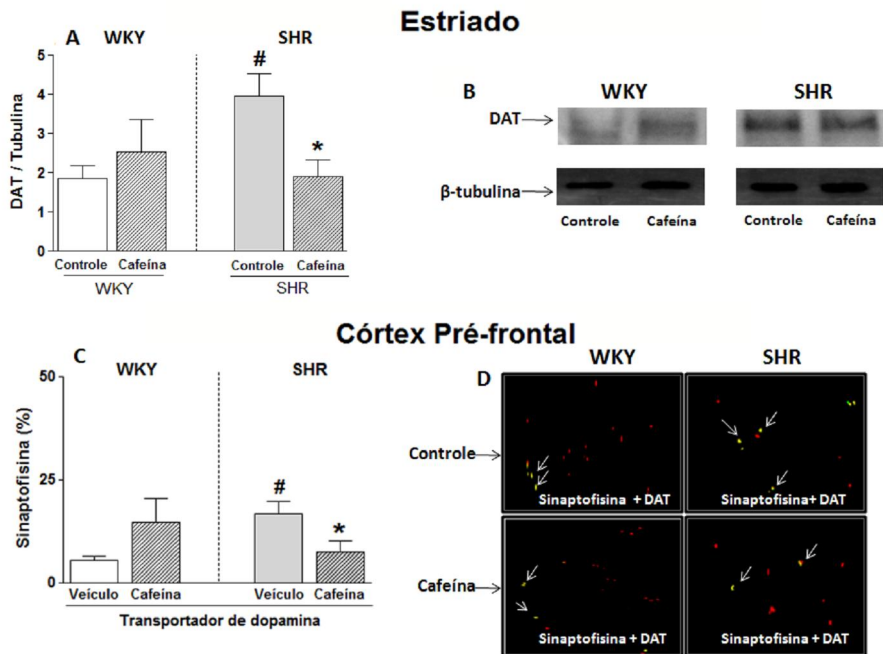


**Figura 22.** Densidade de receptores dopaminérgicos D1 e D2 em terminais nervosos do EST (painel superior, A e B) e CPF (painel inferior, C e D) de ratos WKY e SHR tratados com salina ou cafeína (2 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia durante 21 dias). As densidades foram mensuradas por *Western blot* e normalizadas pela densidade de  $\beta$ -tubulina. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 3-4 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem. <sup>#</sup>p<0,05 quando comparado ao grupo controle da linhagem WKY.

#### 4.6. Transportador de dopamina (DAT)

Os presentes resultados estendem achados prévios (Roessner, Sagvolden *et al.* 2010; Watanabe, Fujita *et al.*, 1997) que mostram uma densidade aumentada de DAT em sinaptossomas do EST e CPF de ratos SHR comparados com WKY. Porém, o mais importante foi a evidência inédita do presente estudo que o tratamento crônico durante a adolescência com cafeína diminuiu significativamente a densidade de DAT em SHR, tanto no EST como no CPF. No EST (Figura 23 A e B, painel superior), resultados obtidos aplicando a técnica de *Western blot*, a ANOVA indicou um efeito signifiante na imunoreatividade de DAT para interação tratamento e linhagem [ $F(1,11) = 4,91$ ;  $P < 0,05$ ]. As comparações entre os grupos revelaram que os terminais nervosos dos SHR possuem uma densidade maior de DAT em relação aos dos WKY. Além disso, o tratamento com cafeína diminuiu significativamente a imunoreatividade de DAT em ratos SHR, mas não em WKY. Em virtude da dificuldade em mensurar DAT no CPF pela técnica de *Western blot*, foi utilizada a técnica de imunocitoquímica em terminais predominantemente pré-sinápticos. Como visto no EST, houve um efeito estatisticamente signifiante da imunoreatividade de DAT para a

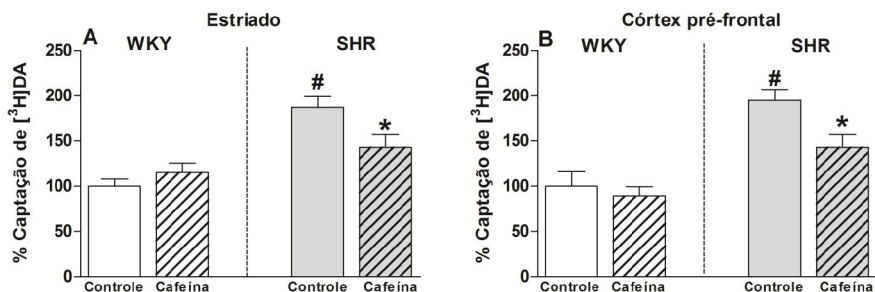
interação tratamento e linhagem [ $F(1,11) = 4,24$ ;  $P < 0,05$ ]; e foi observado que o tratamento com cafeína normalizou a densidade de DAT (Figura 23 C e D, painel inferior).



**Figura 23** Densidade de DAT em terminais nervosos do EST e CPF de ratos WKY e SHR tratados com salina ou cafeína (2 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia durante 21 dias). Os painéis A e B foram construídos a partir de dados obtidos com a técnica de *Western blot* e foram normalizados pela densidade de  $\beta$ -tubulina. Nos painéis C e D foi utilizada a técnica de imunocitoquímica e os dados estão apresentados pelo percentual da imunoreatividade de DAT em lamínulas contendo sinaptofisina. As barras, nos painéis A e C representam a média  $\pm$  E.P.M. de 2-4 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem. (B) bandas representativas obtidas por *Western blot*. (D) imagens representativas obtidas por imunocitoquímica em terminais pré-sinápticos, em vermelho a imunoreatividade de sinaptofisina e em amarelo [sobreposição do vermelho e verde (marcação para DAT)] a co-localização de sinaptofisina com DAT. <sup>#</sup> $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle da linhagem WKY. <sup>\*</sup> $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle da mesma linhagem.

#### 4.7. Captação de dopamina

Em vista aos resultados da alta densidade de DAT e que a atividade dopaminérgica é um dos principais reguladores dos comportamentos exibidos pelos SHR, foi realizado um ensaio de captação de DA em terminais nervosos do EST e CPF. No EST (Figura 24A), a ANOVA revelou um efeito significativo da interação entre os fatores linhagem e tratamento [ $F(1,12) = 41,89$ ;  $P < 0,001$ ] para o percentual de DA captada em relação aos WKY controles. Da mesma forma, diferenças estatisticamente significante foram observadas no CPF para a interação [ $F(1,12) = 4,89$ ;  $P < 0,05$ ] (Figura 24B) no percentual de captação. As comparações indicaram uma captação aumentada de DA em terminais nervosos de SHR em relação aos WKY nas duas áreas cerebrais e o tratamento com cafeína diminuiu significativamente, acompanhando a diminuição da densidade de DAT, a captação de DA nos sinaptossomas dos SHR. Além disso, não foram observadas diferenças significantes na captação de DA com terminais nervosos extraídos de ratos WKY.

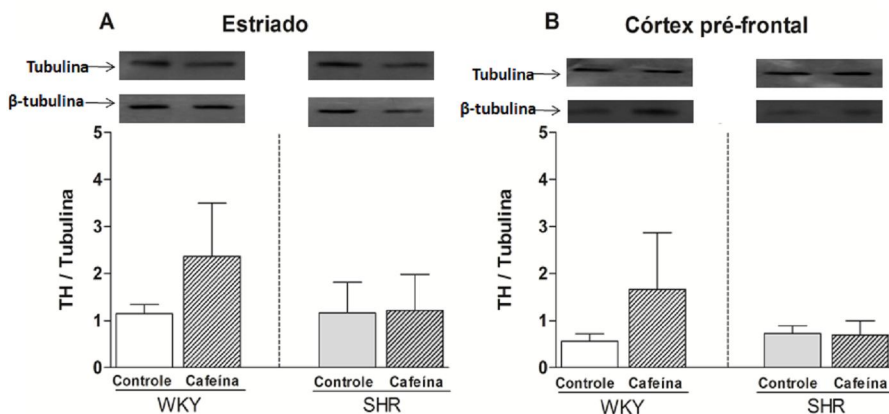


**Figura 24.** Efeitos do tratamento crônico com cafeína (2 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia, durante 21 dias) em ratos WKY e SHR sobre a captação de DA, durante 3 min., em terminais nervosos do EST (A) e CPF (B). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 4 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem. # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle da linhagem WKY. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle da mesma linhagem.

#### 4.8. Enzima tirosina hidroxilase

Ao contrário da alta densidade de transportador e receptores da dopamina vista na linhagem SHR, a análise não mostrou diferenças estatisticamente significantes na imunoreatividade da enzima que

catalisa a síntese de dopamina, tirosina hidroxilase (TH), entre os grupos controles WKY e SHR e nem entre os grupos tratados com salina e cafeína. Os valores foram obtidos utilizando a técnica de *Western blot* estão representados na Figura 25 pela relação entre a densidade de TH e -tubulina.



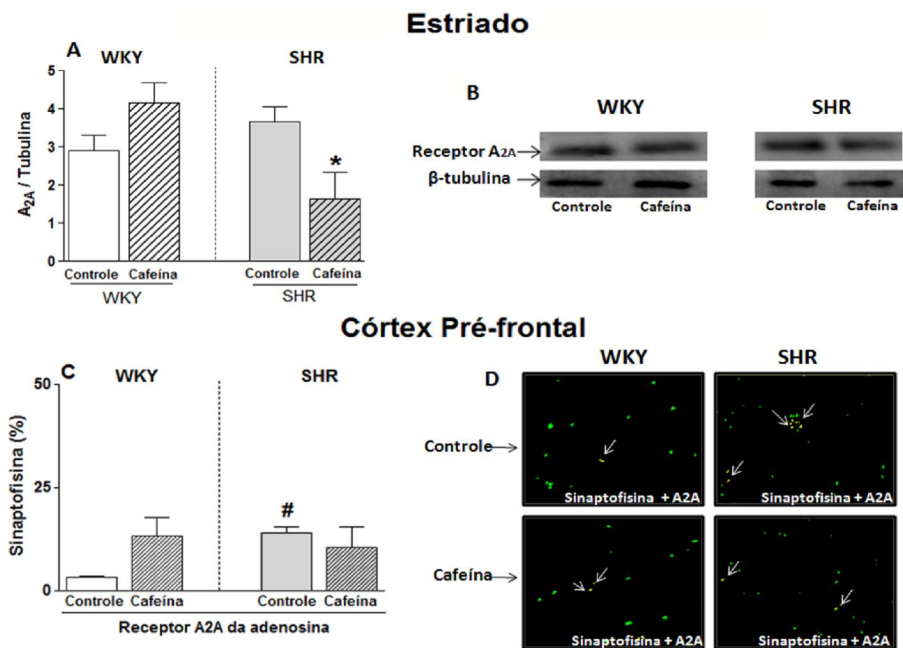
**Figura 25.** Quantificação por Western blot da enzima tirosina hidroxilase em terminais nervosos do EST (A) e CPF (B) de ratos WKY e SHR tratados com salina ou cafeína (2 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia, durante 21 dias). Os dados foram normalizados pela densidade de  $\beta$ -tubulina. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 3-4 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem.

#### 4.9. Receptores $A_{2A}$ da adenosina

A Figura 26 mostra a densidade de receptores  $A_{2A}$  da adenosina em sinaptossomas do EST e CPF, usando as técnicas de *Western blot* e imunocitoquímica, respectivamente; em ratos WKY e SHR tratados ou não com cafeína. No EST (Figura 26, painel superior), houve efeito estatisticamente significativo para interação entre os fatores linhagem e tratamento [ $F(1,12) = 5,01$ ;  $P < 0,05$ ] para a imunoreatividade de  $A_{2A}$  em sinaptossomas. Subsequente teste de Duncan revelou que, apesar da densidade de  $A_{2A}$  não diferir entre os animais WKY e SHR tratados com salina, este parâmetro foi seletivamente diminuído em terminais nervosos de ratos SHR tratados cronicamente com cafeína. No CPF (Figura 26, painel inferior), também houve um efeito estatisticamente significativo para a interação linhagem e tratamento [ $F(1,12) = 5,01$ ;  $P < 0,05$ ] e as comparações mostraram que os terminais nervosos do CPF



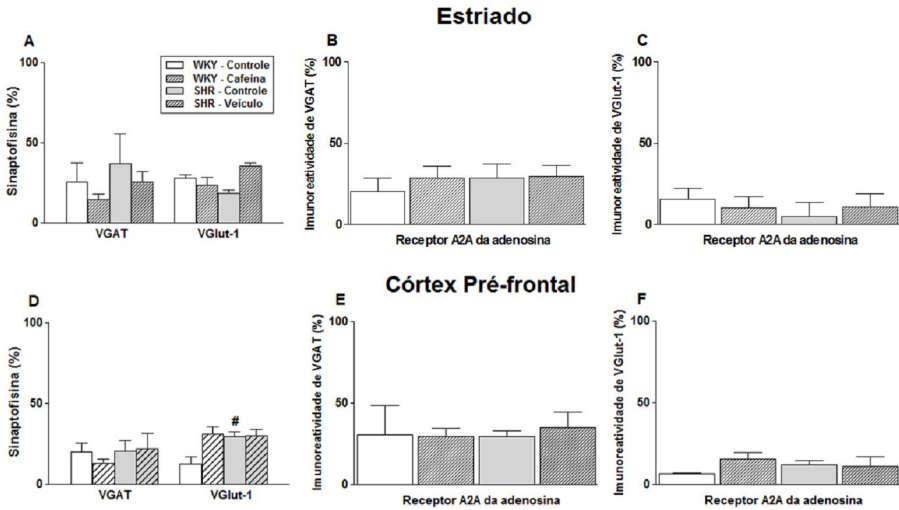
de SHR apresentam uma maior imunoreatividade de receptores  $A_{2A}$  em relação aos WKY.



**Figura 26.** Densidade de receptores  $A_{2A}$  em terminais nervosos do EST e CPF de ratos WKY e SHR tratados com salina ou cafeína (2 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia, durante 21 dias). Os painéis A e B foram construídos a partir de dados obtidos com a técnica de *Western blot* e foram normalizados pela densidade de  $\beta$ -tubulina. Nos painéis C e D foi utilizada a técnica de imunocitoquímica e os dados estão apresentados pelo percentual da imunoreatividade de  $A_{2A}$  em lamínulas contendo sinaptofisina. As barras, nos painéis A e C representam a média  $\pm$  E.P.M. de 2-4 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem. (B) bandas representativas obtidas por *Western blot*. (D) imagens representativas obtidas por imunocitoquímica em terminais pré-sinápticos, em verde a imunoreatividade de sinaptofisina e em amarelo [sobreposição do verde e vermelho (marcação para  $A_{2A}$ )] a co-localização de sinaptofisina com  $A_{2A}$ . # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle da linhagem WKY. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle da mesma linhagem.

#### 4.10. Receptores A<sub>2A</sub> em terminais gabaérgicos e glutamatérgicos

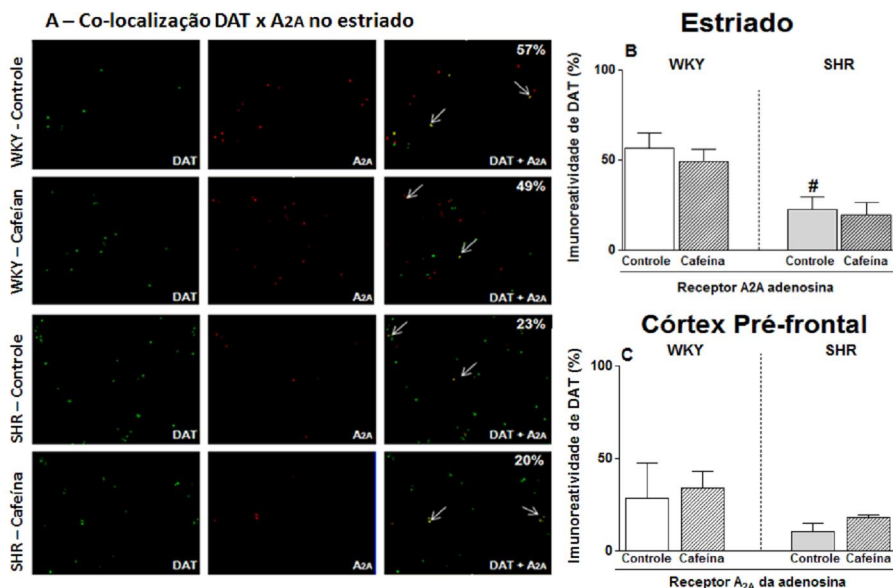
Como descrito anteriormente, os receptores A<sub>2A</sub> estão amplamente expressos em terminais glutamatérgicos e gabaérgicos, e, apesar dos animais SHR apresentarem uma elevada densidade de A<sub>2A</sub> em terminais do CPF, os resultados apresentados na Figura 27 mostram que, no desenho experimental do presente estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na densidade de receptores A<sub>2A</sub> em terminais glutamatérgicos ou gabaérgicos entre os grupos testados. Entretanto, foi observado um efeito significativo para a interação entre tratamento e linhagem na densidade de Vglut-1 em lamínulas do CPF [F(1,5) = 6,58; P<0,05], posteriormente identificado como um aumento na porcentagem (relativa à densidade de sinaptofisina) de marcação de VGlut-1 em comparação à linhagem WKY.



**Figura 27.** Quantificação imunocitoquímica em terminais pré-sinápticos do EST e CPF. (A) e (D), o percentual de elementos marcados para VGAT e VGlut-1 no EST (painel superior) e CPF (painel inferior). Nos demais painéis (B,C,E,F), o percentual de marcação de A<sub>2A</sub> em relação à marcação de VGAT e VGlut-1. As barras representam o percentual da média  $\pm$  E.P.M. de 2-3 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem. #p<0,05 quando comparado ao grupo controle da linhagem WKY.

#### 4.11. Co-localização de DAT e receptores A<sub>2A</sub>

Em virtude das diversas interações, apresentadas na Introdução, dos receptores de A<sub>2A</sub> com sistemas de neurotransmissão, foram investigados as co-localizações dos receptores A<sub>2A</sub> com DAT por imunocitoquímica em sinaptossomas purificados. A Figura 28 mostra a porcentagem de elementos fluorescentes marcados com DAT e/ou A<sub>2A</sub> em terminais pré-sinápticos do EST (A e B) e CPF (C). Os resultados sugerem, pela primeira vez, que os receptores A<sub>2A</sub> podem estar co-localizados com os DAT tanto no EST como no CPF. Além disso, a ANOVA de duas vias indicou um efeito estatisticamente significativo do fator linhagem [F(1,7) = 6,98; P<0,05] no EST para a imunoreatividade de A<sub>2A</sub> e DAT. Subseqüente teste de Duncan revelou que, apesar da alta densidade de DAT (Figura 23), os terminais nervosos dos SHR apresentaram uma co-localização diminuída entre A<sub>2A</sub> e DAT em comparação aos WKY. Contudo, no CPF, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos fatores analisados.

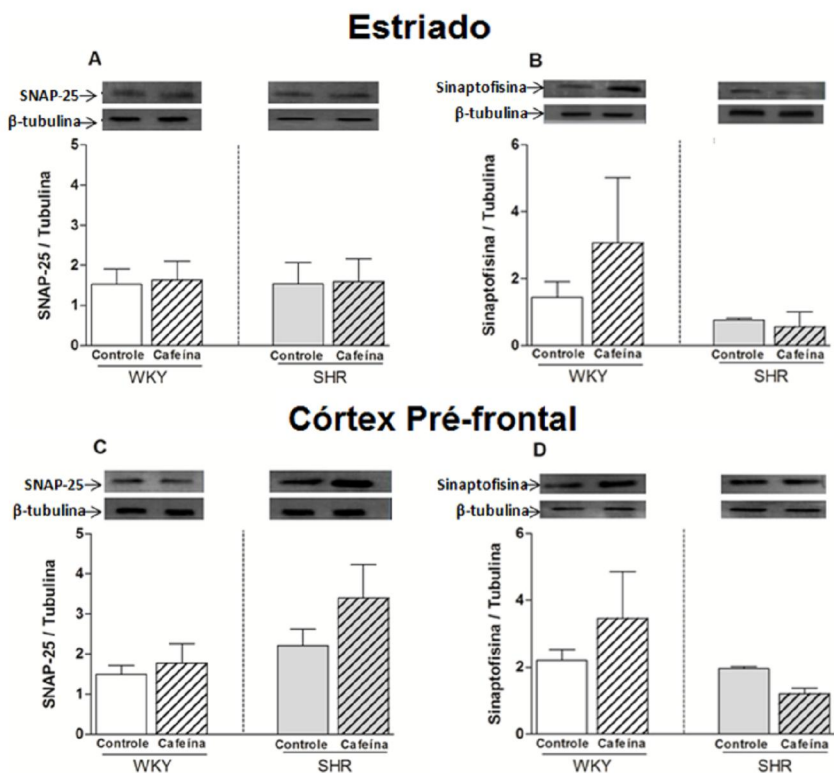


**Figura 28.** Quantificação imunocitoquímica de receptores A<sub>2A</sub> e/ou DAT em terminais nervosos do EST (A e B) e CPF (C) obtidos de ratos WKY e SHR tratados com salina ou cafeína (2 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia durante 21 dias). As barras, nos painéis B e C representam a média ± E.P.M. de 2-4 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem. (A) imagens

representativas de terminais pré-sinápticos, em verde a imunoreatividade de DAT, vermelho de A<sub>2A</sub> e amarelo (verde mais vermelho) a co-localização de A<sub>2A</sub>. # p<0,05 quando comparado ao grupo que recebeu salina da linhagem WKY.

#### 4.12. SNAP-25 e sinaptofisina.

Os níveis das proteínas pré-sinápticas SNAP-25 e sinaptofisina foram medidos pela técnica de *Western blot*. A Figura 29 mostra os resultados obtidos com sinaptossomas do EST (painel superior) e CPF (painel inferior) de ratos WKY e SHR tratados com salina ou cafeína. A ANOVA indicou que não existem diferenças estatisticamente significantes nas variáveis independentes analisadas.

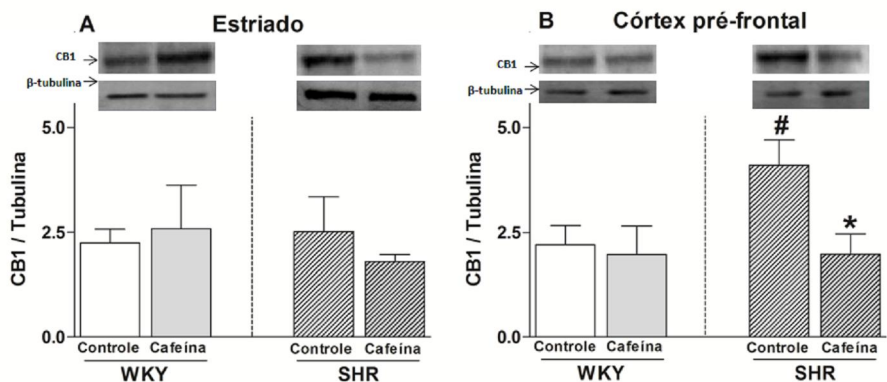


**Figura 29.** Quantificação por Western blot das proteínas SNAP-25 (A e C) e sinaptofisina (B e D) em terminais obtidos a partir do EST (painel superior) e CPF (painel inferior) de ratos WKY e SHR tratados com salina ou cafeína (2

mg/kg, i.p., duas vezes ao dia durante 21 dias). Os dados foram normalizados pela densidade de  $\beta$ -tubulina. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 3-4 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem.

### 4.13. Receptores canabinóides CB1

Os resultados da Figura 30 mostram os níveis de outro importante modulador pré-sináptico, os receptores CB1. Como observado para receptores  $A_{2A}$ , os terminais do CPF de SHR apresentam alta densidade de CB1 em relação aos WKY ( $p < 0,05$ ). Além disso, o tratamento crônico com cafeína normalizou os níveis de CB1 no CPF. Não foi observado efeito estatisticamente significativo para o tratamento na linhagem WKY.

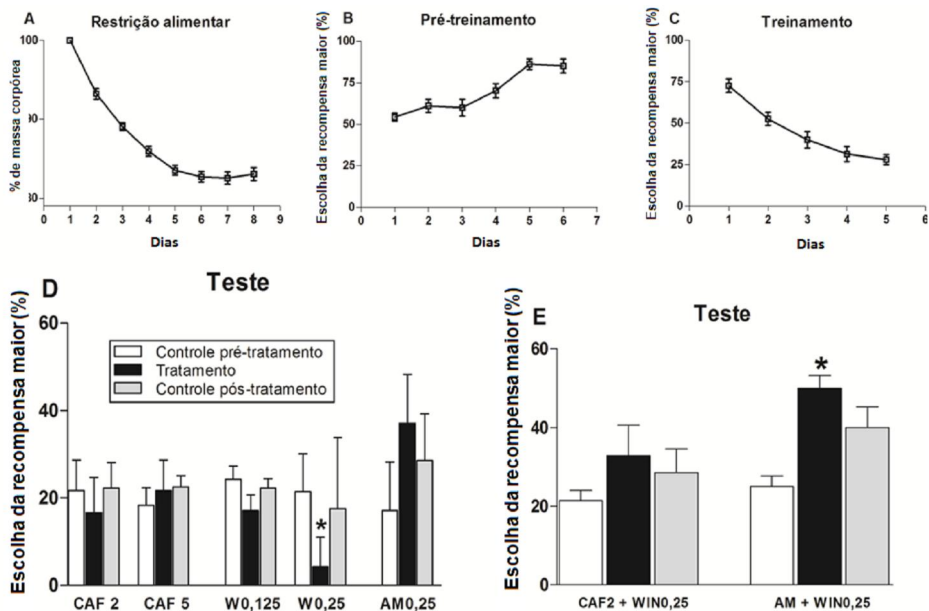


**Figura 30.** Níveis de receptores CB1 quantificados por Western blot em terminais nervosos do EST (A) e CPF (B) de ratos WKY e SHR tratados com salina ou cafeína (2 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia durante 21 dias). Os dados foram normalizados pela densidade de  $\beta$ -tubulina. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 3-4 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem. # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle da linhagem WKY. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle da mesma linhagem.

#### **4.14 Impulsividade**

Após identificar as diferenças entre os animais WKY e SHR, grupos independentes de animais SHR foram avaliados quanto à impulsividade no teste da tolerância ao atraso da recompensa. A Figura 31 ilustra os resultados obtidos nas diferentes partes do protocolo: (A) restrição alimentar, (B) pré-treinamento, (C) Treinamento e (D e E) teste. Em (A), animais adultos (9-11 semanas) pesavam cerca de 220 g no início do experimento e após uma semana de restrição alimentar cada animal teve o seu peso mantido em aproximadamente 180 g. No primeiro dia da fase de pré-treinamento, os animais faziam cerca de 50% de escolhas para a recompensa maior e, ao longo desta fase, a preferência foi aumentando até atingir cerca de 80% nos dois últimos dias. Quando o atraso foi introduzido, na fase de treinamento (C), a preferência ao braço com a recompensa grande caiu já no primeiro dia de 80% a 75%, chegando a cerca de 25% no último dia de treinamento. Esta diminuição revela os traços impulsivos dos animais SHR quando um atraso de 15 s. foi introduzido antes da entrega da recompensa. No dia do teste (D), as comparações indicaram que a administração do agonista canabinóide WIN (0,25 mg/kg) induziu um aumento no comportamento impulsivo dos animais SHR, como indicado pela diminuição do percentual de escolhas para o braço com a recompensa grande ( $p < 0,05$ ). A administração de cafeína (2 e 5 mg/kg) ou do antagonista canabinóide AM251 (0,25 mg/kg) não alterou o comportamento impulsivo medido pelo presente teste.

Em outro experimento (Figura 31E), foi avaliado se as propriedades reforçadoras do WIN (0,25 mg/kg) em ratos SHR podiam ser antagonizadas pela administração prévia de cafeína (2 mg/kg) ou do antagonista canabinóide AM251 (0,25 mg/kg). A administração de cafeína 20 min. antes do tratamento com WIN impediu o aumento de impulsividade induzido pelo WIN. E, de maneira inesperada, a associação de AM251 e WIN aumentou significativamente a porcentagem de escolhas da recompensa grande ( $p < 0,05$ ) em relação aos dias anteriores (controle pré-droga).



**Figura 31.** Teste da tolerância ao atraso da recompensa. Efeitos do tratamento com cafeína (2 ou 5 mg/kg), com o agonista canabinóide WIN (W, 0,125 ou 0,25 mg/kg) e/ou com o antagonista canabinóide AM251 (0,25 mg/kg) no percentual de escolhas da recompensa grande em ratos SHR adultos. (A) perda de peso ao longo do tempo de restrição alimentar, 8 dias. Percentual de escolhas da recompensa grande na fase de pré-treino (B), treinamento (C) e teste (D). (E) fase de teste do experimento com antagonistas. Os dados estão representados pela média  $\pm$  E.P.M. de 6-8 animais. \* $p < 0,05$  em comparação ao “controle pré-tratamento”.

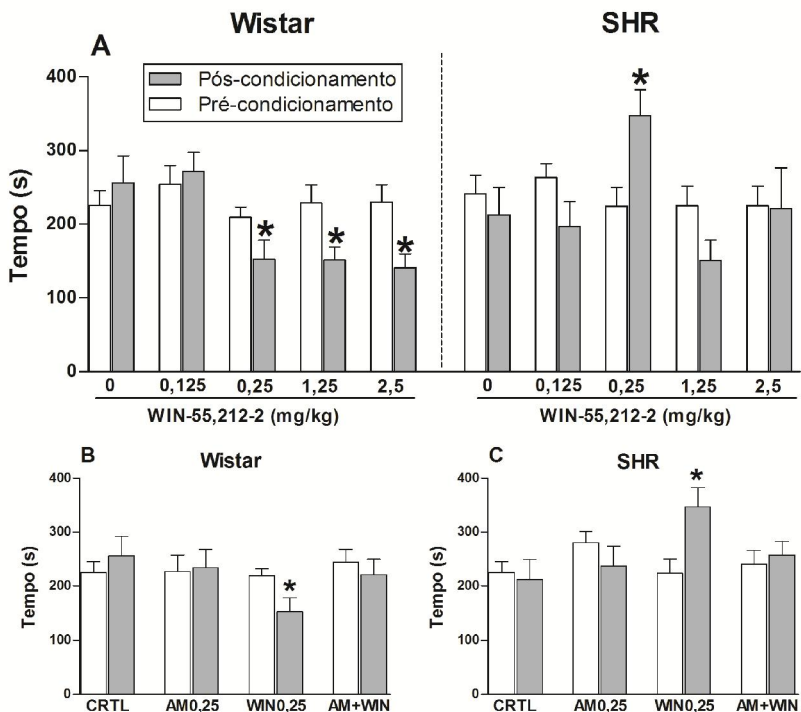
#### 4.15. Propriedades aversivas e reforçadoras do WIN na PCL

As propriedades reforçadoras e aversivas decorrentes da ativação dos receptores CB1 em ratos Wistar e SHR medidas na preferência condicionada ao lugar (PCL) estão sumarizados na Figura 32. Primeiro, os efeitos do agonista canabinóide WIN (0,125; 0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg) parecem ter um caráter dependente da linhagem, a ANOVA de três vias mostrou um efeito estatisticamente significativo da interação entre repetição (pré e pós-condicionamento), linhagem e tratamento [ $F(4,75) = 4,98$ ;  $P < 0,01$ ] para o tempo gasto no compartimento pareado com o WIN antes e depois da sessão de

condicionamento. Então, o teste post-hoc de Duncan, para comparações múltiplas, foi empregado e revelou que os ratos condicionados com veículo, Wistar e SHR, não diferem em termos de preferência ao lugar. Entretanto, o tratamento com WIN claramente induziu aversão em ratos Wistar, verificada pela significativa diminuição do tempo de permanência no compartimento emparelhado com as doses de 0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg de WIN (Figura 32A, lado esquerdo) após o condicionamento. Apesar da alta prevalência do uso derivados da *cannabis* em humanos, aversão a canabinóides tem sido predominantemente relatada. Os resultados mostraram pela primeira vez que o tratamento com um canabinóide induz PCL em ratos SHR, aumentando o tempo de permanência no compartimento pareado com a dose de 0,25 mg/kg de WIN (Figura 32A, lado direito).

Os painéis 32 “B” e “C” ilustram os efeitos do antagonista AM251 nas propriedades aversivas e reforçadores da ativação canabinóide em ratos Wistar e SHR, respectivamente. A ANOVA de três vias, medida repetida (pré e pós condicionamento), linhagem e tratamento, revelou um efeito estatisticamente significativo da interação entre os três fatores [ $F(3,55) = 21,52$ ;  $P < 0,001$ ] no tempo de permanência no compartimento pareado com o WIN. Para ratos Wistar (B), o tratamento com WIN (0,25 mg/kg) novamente induziu aversão ao lugar de condicionamento e a administração prévia de AM251 (0,25 mg/kg) impediu a aquisição da aversão causada pelo WIN na PCL. Da mesma maneira, em ratos SHR, o AM251, que por si não produziu efeito, impediu a PCL induzida pelo WIN. Os resultados mostram que a aversão e o efeito de reforço do WIN em ratos Wistar e SHR, respectivamente, estão mediados pelos receptores CB1.



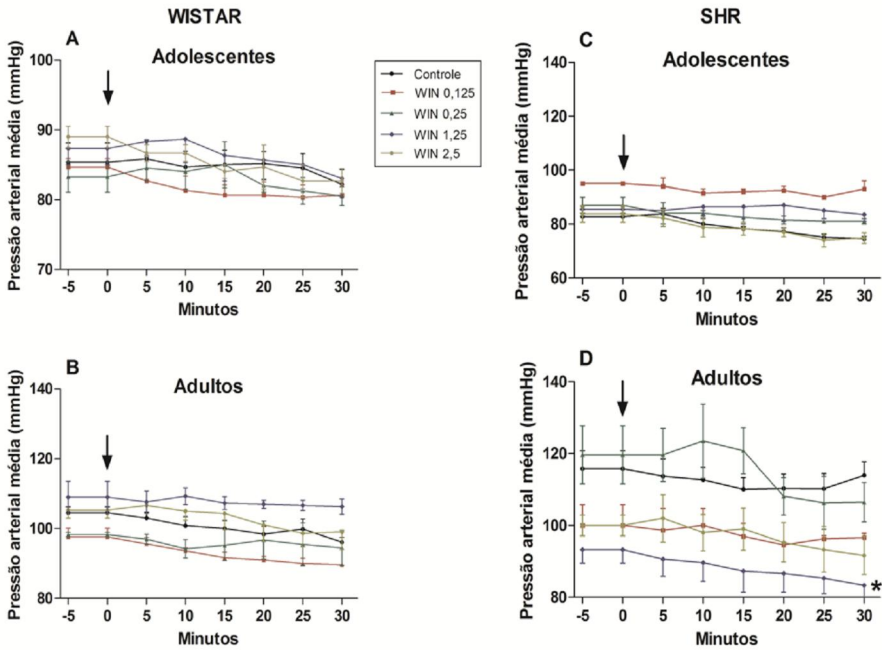


**Figura 32.** Efeitos do tratamento com o agonista canabinóide WIN (0,125; 0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg) e/ou com o antagonista canabinóide AM251 (0,25 mg/kg) na PCL em ratos Wistar e SHR. (A) ampla faixa de doses de WIN. (B) e (C) antagonismo das propriedades aversivas e reforçadoras, respectivamente. Histogramas representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8-10 animais. CTRL: grupo controle. \* $p < 0,05$  em comparação a sessão de pré-condicionamento.

#### 4.16. Pressão arterial média

Considerando que a hipertensão apresentada pelos SHR pode interferir nos estudos comportamentais e que prévios estudos relataram efeitos cardiovascular de canabinóides em ratos normotensos e SHR (Lake, Compton *et al.*, 1997; Batkai, Pacher *et al.*, 2004; Wheal, Bennett *et al.*, 2007), o interesse agora foi comparar a pressão arterial (PA) de ratos adolescentes e adultos das linhagens WKY e SHR e investigar o efeito de uma ampla faixa de dose do agonista canabinóide WIN (0,125 – 2,5 mg/kg) na PA ao longo de 30 min. A ANOVA de três

vias revelou um efeito estatisticamente significativo da idade [ $F(1,54) = 79,95$ ;  $P < 0,01$ ] e da interação entre os fatores idade, linhagem e tratamento [ $F(4,54) = 4,40$ ;  $P < 0,01$ ] para a pressão média arterial. As comparações indicaram que, como esperado, os ratos SHR apresentaram uma maior pressão arterial em relação aos Wistar (independentemente da idade) e aos SHR adolescentes. Além disso, a dose de 1,25 mg/kg de WIN induziu uma diminuição significativa na PA dos ratos SHR adultos (Figura 33).

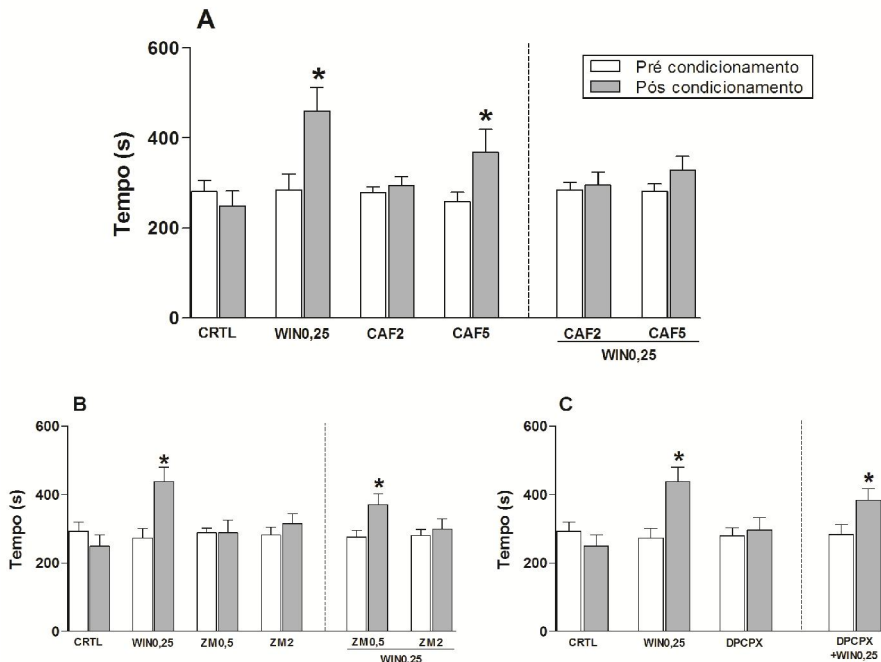


**Figura 33.** Efeitos da administração i.p. do agonista canabinóide WIN (0,125 – 2,5 mg/kg) na pressão arterial média (em mmHg) de ratos adolescentes (painel superior) e adultos (painel inferior) das linhagens Wistar (A e B) e SHR (C e D) durante 30 min. As linhas representam a média  $\pm$  E.P.M. de 3-6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle da mesma linhagem.

#### **4.17. Antagonistas de receptores da AD na PCL induzida pelo WIN**

Uma vez verificada as diferenças entre as linhagens Wistar e SHR na PCL de um canabinóide, o próximo passo foi investigar a participação do sistema adenosinérgico nas propriedades reforçadoras do WIN (0,25 mg/kg) apenas em ratos SHR. Primeiro, o sabido potencial reforçador da cafeína foi agora testado em ratos SHR testados na PCL (Figura 34A). A análise de ANOVA de duas vias mostrou um efeito estatisticamente significativo da interação entre tratamento e medidas repetidas [ $F(5,41) = 4,04$ ;  $P < 0,01$ ] para o tempo de permanência no compartimento pareado com WIN antes e depois da sessão de condicionamento. Subsequente teste de Duncan indicando outra vez PCL no grupo tratado com WIN 0,25 mg/kg e a maior dose testada de cafeína 5 mg/kg também promoveu efeitos reforçadores em ratos SHR, enquanto que a dose de 2 mg/kg de cafeína não alterou o tempo que os animais ficaram no compartimento antes e depois do condicionamento. Para a associação de cafeína com WIN (Figura 34A, lado direito), tanto a dose de cafeína que não casou efeito por si (2 mg/kg) como a dose que induziu PCL (5 mg/kg) foram capazes de impedir a aquisição da PCL promovida pelo WIN (0,25 mg/kg).

A etapa seguinte foi apurar se o bloqueio da PCL induzida pelo WIN em ratos SHR estava mediado pelos receptores  $A_{2A}$  e/ou  $A_1$  da adenosina (Figura 34 B e C, respectivamente). A análise estatística foi realizada separadamente para cada ligante. Para o antagonista dos receptores  $A_{2A}$  (B), a ANOVA de duas vias revelou um efeito estatisticamente significativo da interação entre medidas repetidas e tratamento [ $F(5,41) = 4,57$ ;  $P < 0,01$ ] para o tempo de permanência. Além da PCL causada pelo WIN (0,25 mg/kg), as comparações mostraram que as duas doses testadas de ZM (0,25 e 2 mg/kg) não alteram o tempo gasto no compartimento após o condicionamento e somente a associação da maior dose de ZM (2 mg/kg) foi capaz de impedir a PCL induzida pelo WIN. A situação oposta foi observada para o antagonista  $A_1$  (C), apesar da ANOVA ter indicado efeito significativo da interação entre medidas repetidas e tratamento [ $F(3,29) = 5,80$ ;  $P < 0,01$ ], a associação de uma dose ineficaz de DPCPX (2 mg/kg) não bloqueou a aquisição de PCL induzida pelo WIN.



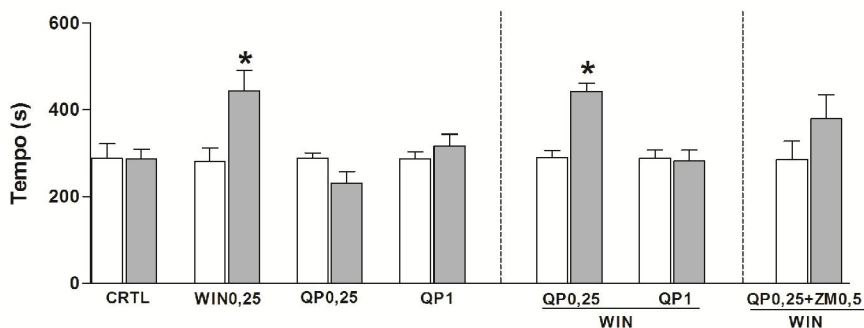
**Figura 34.** Efeitos da associação do agonista canabinóide WIN (0,25 mg/kg) com cafeína (2 e 5 mg/kg, A), antagonista de receptores  $A_{2A}$  ZM (0,25 e 2 mg/kg, B) ou do antagonista de receptores  $A_1$  DPCPX (2 mg/kg, C) na preferência condicionada ao lugar (PCL) em ratos SHR. Histogramas representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8-9 animais. CTRL: grupo controle. \* $p < 0,05$  em comparação a sessão de pré-condicionamento.

#### 4.18 Interação dos receptores da DA e AD na PCL induzida pelo WIN

A partir das interações antagonísticas dos receptores de DA e AD apresentadas na Introdução, a associação de um agonista de receptores  $D_2$  e  $D_3$  (Quinpirole, QP) com um antagonista de receptores  $A_{2A}$  (ZM) foi avaliada nas propriedades reforçadoras do WIN em SHR. Antes disso, duas doses de quinpirole (0,25 e 1 mg/kg) foram testadas na presença ou na ausência de WIN (Figura 35, lado esquerdo e meio), a ANOVA de duas vias revelou efeito estatisticamente significativo da interação dos fatores tratamento e medidas repetidas [ $F(5,31) = 5,92$ ;  $P < 0,001$ ] para o tempo gasto no compartimento pareado com WIN antes e depois da sessão de condicionamento. Reproduzindo os dados

anteriores, o WIN causou PCL e ambas as doses de QP testadas não tiveram efeito por si. Por outro lado, a administração prévia da maior dose de QP (1 mg/kg) 20 min. antes do condicionamento com WIN impediu a aquisição da PCL.

Em um experimento à parte, doses ineficazes de ZM (0,25 mg/kg) e QP (0,25 mg/kg) 20 min foram administradas antes da administração de WIN. Apesar da ANOVA de duas vias ter revelado um efeito estatisticamente significativo da interação tratamento e medidas repetidas [ $F(2,17) = 3,94$ ;  $P < 0,05$ ], o teste de Duncan indicou apenas um tendência ( $p = 0,06$ ) de PCL para o grupo que recebeu a associação de QP e ZM antes do WIN, sugerindo que ambos os sistemas ( $A_{2A}$  e  $D_2/D_3$ ) estão envolvidos nos efeitos reforçadores de um canabinoide (Figura 35, lado direito).

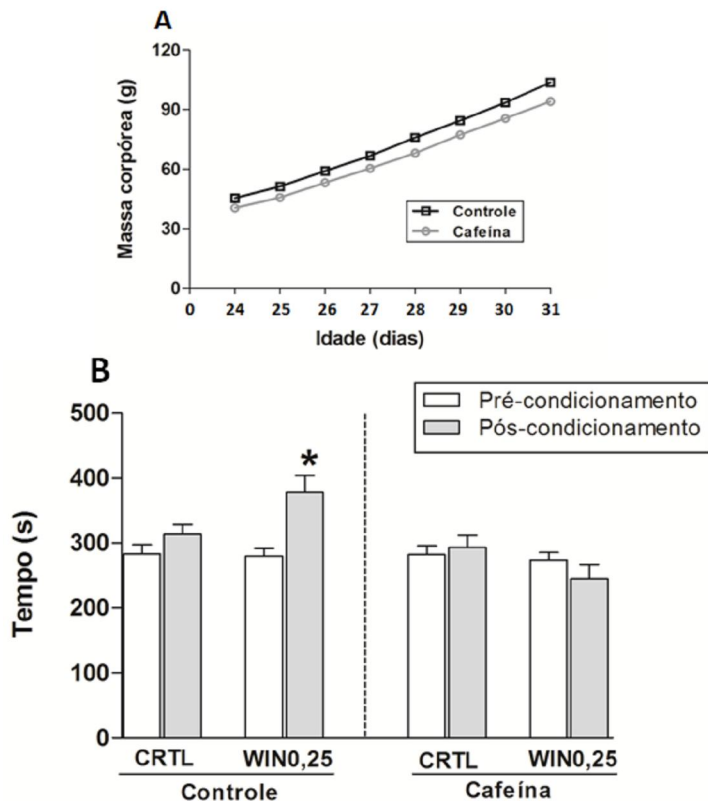


**Figura 35.** Efeitos do agonista  $D_2/D_3$  da dopamina quinpirole (QP, 0,25 ou 1 mg/kg) e da sua associação com o agonista canabinoide WIN (0,25 mg/kg) e/ou com o antagonista  $A_{2A}$  ZM (0,25 mg/kg) na PCL em ratos SHR. Histogramas representam a média  $\pm$  E.P.M. de 6-8 animais por grupo. CTRL: grupo controle. \* $p < 0,05$  em comparação a sessão de pré-condicionamento.

#### 4.19. Tratamento crônico com cafeína na PCL induzida pelo WIN

Nesta última etapa experimental, foi investigado se o tratamento crônico com cafeína, que normalizou a densidade de DAT corticoestriatal e melhorou os prejuízos cognitivos, era capaz de impedir a PCL induzida pelo WIN em ratos SHR. A Figura 36A mostra que o peso corporal dos animais SHR tratados cronicamente durante a adolescência com salina ou cafeína não foi alterado. A ANOVA indicou um efeito estatisticamente significativo da interação entre os fatores tratamento e medidas repetidas [ $F(5,37) = 7,29$ ;  $P < 0,001$ ] para o tempo gasto no compartimento pareado com WIN antes e depois do

condicionamento (Figura 36B). As comparações subseqüentes mostraram que somente os animais tratados com salina e condicionados com WIN desenvolveram PCL, indicando que a cafeína diminui os efeitos reforçadores de um agonista canabinóide.



**Figura 36.** Efeitos do tratamento crônico, durante a adolescência, com salina ou cafeína (2 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia) na PCL induzida pelo agonista canabinóide WIN (0,25 mg/kg, i.p.) em ratos SHR. (A) massa corporal durante o tratamento e (B) tempo de permanência antes e depois do condicionamento. Histogramas representam a média  $\pm$  E.P.M. de 7-8 animais por grupo. CRTL: grupo controle. \* $p < 0,05$  em comparação a sessão de pré-condicionamento.

## 5. DISCUSSÃO

A principal hipótese desta tese era que os receptores da AD participavam do perfil comportamental e neuroquímico observado em um modelo fidedigno do TDAH. De fato, o tratamento com cafeína ou antagonistas seletivos dos receptores  $A_1$  ou  $A_{2A}$  influencia aspectos cognitivos ou motivacionais modelados pela linhagem SHR; existem diferenças entre as linhagens WKY e SHR para os níveis de receptores da  $A_{2A}$  e para a co-localização destes receptores com o DAT em terminais pré-sinápticos do CPF e do EST, respectivamente; e o tratamento crônico com cafeína normaliza a densidade de DAT e a captação de DA nas duas áreas cerebrais. O presente estudo fornece as primeiras evidências do potencial terapêutico da cafeína tanto na desatenção exibida por um modelo animal do TDAH quanto na relação deste transtorno com respostas impulsivas e motivacionais produzidas por drogas. Além disso, este trabalho inaugura o entendimento das bases moleculares envolvidas nos efeitos benéficos da cafeína sobre as características do TDAH.

Em paralelo, os resultados do presente estudo confirmam os ratos SHR como um modelo do TDAH, uma vez que os animais desta linhagem exibiram características comportamentais similares aos sintomas observados no transtorno: desatenção, hiperatividade e impulsividade. Ainda, os SHR apresentaram modificações dopaminérgicas na via corticoestriatal quando comparados aos ratos da linhagem WKY: densidade aumentada de receptores  $D_1$  e  $D_2$  no CPF, densidade aumentada de receptores  $D_1$  no EST, densidade aumentada de DAT e captação aumentada de DA em ambas as estruturas. Esses dados são condizentes com a hipótese de que uma hipofunção dopaminérgica está subjacente às alterações comportamentais vistas na linhagem SHR e em portadores do TDAH.

Conforme foi comentado na Introdução, prejuízos no processamento das funções executivas estão associados com o TDAH. E o desequilíbrio no sistema dopaminérgico corticoestriatal pode repercutir em diversos sistemas neurais, levando a uma série de alterações cognitivas (Floresco e Magyar, 2006), tais como desatenção e prejuízos de flexibilidade comportamental. No presente estudo foi utilizado um teste (*attentional set-shifting*) que fornece parâmetros indicativos da capacidade dos animais tanto em manter a atenção em uma seqüência de mudanças ambientais (erros regressivos e nunca-reforçados) quanto em alternar o comportamento diante de uma situação nova (erros perseverantes). Neste contexto, animais com dificuldade em

manter a atenção fazem mais erros regressivos e nunca-reforçados, enquanto que problemas de flexibilidade comportamental resultam em mais erros perseverantes (Floresco, Magyar *et al.*, 2006). Os resultados encontrados demonstram que os ratos SHR apresentam um aumento no número de erros regressivos e nunca-reforçados quando comparados aos WKY, caracterizando a desatenção da linhagem SHR nesta tarefa. Além disso, não foram observadas diferenças entre as linhagens em relação aos erros perseverantes. O mesmo perfil de respostas foi observado em dados prévios da literatura (Kantak, Singh *et al.*, 2008). Da mesma maneira que indivíduos com TDAH, mesmo desatentos, não fazem significativamente mais erros perseverantes do que indivíduos normais em tarefas de flexibilidade comportamental (Grodzinsky e Barkley, 1999; Scheres, Oosterlaan *et al.*, 2004).

O tratamento crônico com cafeína durante o período da adolescência melhorou o desempenho dos ratos SHR tanto em criar uma simples estratégia egocêntrica (Figura 19A e B) quanto em manter a atenção perante uma complexa seqüência de mudanças (Figura 19C). Quando administrada agudamente, os efeitos da cafeína são predominantemente mediados pelos receptores  $A_1$ , uma vez que esses receptores são preferencialmente ativados pela AD em condições fisiológicas (Ballarin, Fredholm *et al.*, 1991). Embora a cafeína seja um antagonista não seletivo com a afinidade semelhante para os receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , a cronicidade do tratamento pode alterar o mecanismo pelo qual exerce seus efeitos (Ramkumar, Bumgarner *et al.*, 1988; Jacobson, Von Lubitz *et al.*, 1996; Ciruela, Casado *et al.*, 2006; Ferre, Quiroz *et al.*, 2008). A exposição crônica de cafeína aumenta os níveis extracelulares de AD (Conlay, Conant *et al.*, 1997) causando a tolerância dos receptores  $A_1$  à cafeína (Klotz, Hessling *et al.*, 1998). Nestas condições, os efeitos da cafeína nos receptores  $A_1$  são diminutos e o papel dos receptores  $A_{2A}$  torna-se prevalente (Klotz, Hessling *et al.*, 1998).

Da mesma forma, os efeitos estimulantes da cafeína também dependem do tempo de exposição. Acredita-se que os receptores  $A_1$  sejam os protagonistas da estimulação motora produzida pela administração aguda de cafeína (Antoniou, Papadopoulou-Daifoti *et al.*, 2005). Uma possível explicação para o mecanismo da tolerância motora induzida pela cafeína foi dada por Ciruela, Casado e colaboradores (2006); estes autores mostraram que a função de heterômeros  $A_1$ - $A_2$  no EST, os quais modulam a transmissão glutamatérgica, pode ser modificada pelo tratamento crônico com cafeína. Contudo, embora os



receptores  $A_{2A}$  possuam uma pequena participação nos efeitos estimulantes agudos da cafeína, eles são fundamentais nos efeitos residuais de estimulação em indivíduos tolerantes a cafeína (Karcz-Kubicha, Antoniou *et al.*, 2003). Além disso, outros estudos mostram que antagonistas seletivos para  $A_1$  podem induzir estimulação motora e ainda potencializar os efeitos de antagonistas seletivos  $A_{2A}$  (Popoli, Reggio *et al.*, 1998). Em conjunto, esses estudos contêm resultados corroborando a idéia de que antagonistas seletivos  $A_{2A}$  induzem apenas uma fraca estimulação motora (Svenningsson, Nomikos *et al.*, 1997; El Yacoubi, Ledent *et al.*, 2000) e não produzem tolerância após tratamento repetido (Halldner, Lozza *et al.*, 2000). Embora não haja dúvidas do envolvimento dos receptores de AD sobre a ativação motora, no presente estudo não foram encontradas diferenças na hiperatividade apresentada pelos SHR após o tratamento crônico com cafeína (Figura 21B).

Recentemente, foi demonstrado que os receptores  $A_{2A}$  no EST podem ter funções opostas aos do córtex e hipocampo sobre o controle motor (Shen, Coelho *et al.*, 2008). Neste estudo, os animais com eliminação gênica dos receptores  $A_{2A}$  especificamente no EST foram sensíveis aos efeitos estimulantes da cocaína, enquanto que os animais com eliminação gênica no córtex e no hipocampo apresentaram uma atenuação na resposta estimulatória da cocaína. Esta dissociação no funcionamento dos receptores  $A_{2A}$  entre regiões do EST e corticais pode ser atribuída, não somente a alta densidade de dímeros  $A_{2A}$ -D<sub>2</sub> no EST e as suas interações antagônicas (Ferre, 1997), mas também por uma possível regulação da disponibilidade sináptica de DA através da interação entre os DAT e os receptores  $A_{2A}$  (Figura 28). Além disso, a modulação contrastante dos receptores  $A_{2A}$ , dependente da localização cerebral, sobre os efeitos motores, sugerem que os receptores  $A_{2A}$  podem orquestrar diferenciadamente o funcionamento executivo e controle motor. Esta especulação está apoiada pelos efeitos benéficos da cafeína sobre os aspectos cognitivos (Figura 19 e 21), mas não sobre os hiperativos, possivelmente por estarem associados com a alta densidade de receptores  $A_{2A}$  no CPF (Figura 26) e com a reduzida co-localização de  $A_{2A}$ -DAT no EST (Figura 28) de ratos SHR.

Já a influência da cafeína sobre a emocionalidade permanece sob debate, acredita-se que os efeitos dependam não só do esquema de tratamento, mas também da dose de cafeína utilizada. Alguns resultados mostram que a cafeína aumenta a ansiedade em humanos (Greden, 1974; Uhde, Boulenger *et al.*, 1984; Bruce, 1990), enquanto outros

mostram o desenvolvimento de tolerância aos efeitos ansiogênicos (Evans e Griffiths, 1992). A tolerância aos efeitos ansiogênicos da cafeína também têm sido demonstrada em ratos, utilizando diferentes testes de ansiedade (File, Baldwin *et al.*, 1988; Bhattacharya, Satyan *et al.*, 1997). Além disso, altas doses de cafeína podem aumentar enquanto baixas doses tendem a diminuir os níveis de ansiedade em humanos (Greden, 1974; Loke, 1988; Sicard, Perault *et al.*, 1996; Lieberman, Tharion *et al.*, 2002). De qualquer forma, o impacto do tratamento com cafeína sobre os traços de ansiedade em indivíduos com TDAH tem sido muito pouco estudado. Os ratos SHR exibem um baixo perfil de ansiedade no teste do campo aberto quando comparados aos WKY (Figura 20A) e a ratos de outras linhagens (Ramos, Berton *et al.*, 1997; Pandolfo, Pamplona *et al.*, 2007). E o tratamento crônico com cafeína de maneira diferente ao MFD (Vendruscolo, Izídio *et al.*, 2008) não alterou os comportamentos relacionados à ansiedade em WKY ou em SHR, o que pode ser uma perspectiva favorável no tratamento dos prejuízos cognitivos que afetam portadores do TDAH.

Há uma concordância entre as evidências obtidas na clínica ou em modelos animais que a cafeína previne prejuízos de memória (Cunha e Agostinho 2010; Ritchie, Carriere *et al.*, 2007; Takahashi, Pamplona *et al.*, 2008). Os resultados do presente estudo estão condizentes com essas evidências; os animais da linhagem SHR, que apresentaram um prejuízo na memória de reconhecimento espacial de curto-prazo, melhoraram o desempenho cognitivo após o tratamento crônico com cafeína [(Figura 19 – atenção) e (Figura 21 – memória espacial)]. Embora tanto os receptores  $A_1$  quanto os receptores  $A_{2A}$  tenham papel fundamental no processamento cognitivo (Mihara, Mihara *et al.*, 2007), a cronicidade do tratamento sugere que a melhora cognitiva dos ratos SHR pela cafeína esteja mediada preferencialmente pelos receptores  $A_{2A}$ . Esta hipótese está reforçada pelo fato que a cafeína ou o ZM241385 (antagonista seletivo  $A_{2A}$ ), mas não o DPCPX (antagonista seletivo  $A_1$ ), reverte o prejuízo no reconhecimento social de ratos SHR (Prediger, Fernandes *et al.*, 2005), de ratos com baixos níveis cerebrais de catecolaminas (Prediger, Da Cunha *et al.*, 2005) e de ratos idosos (Prediger, Batista *et al.*, 2005). Além disso, recentemente foi demonstrado que o tratamento agudo (Pires, Pamplona *et al.*, 2009) ou crônico (Pires, Pamplona *et al.* 2010) com cafeína melhora a aprendizagem discriminativa de ratos SHR em uma tarefa de reconhecimento de objetos. E o envolvimento dos receptores  $A_{2A}$  nos efeitos positivos do tratamento crônico com cafeína sobre a desatenção e

memória espacial está fortalecido por estudos prévios. Por exemplo, os dados de Higgins, Grzelak e colaboradores (2007) sugerem que a cafeína aumenta a atenção seletiva em ratos normais, preferencialmente através dos receptores  $A_{2A}$ . E camundongos com eliminação gênica dos receptores  $A_{2A}$  apresentaram uma melhora significativa na memória de reconhecimento espacial, avaliada em um labirinto em “Y” (Wang, Ma *et al.*, 2006).

O papel do sistema dopaminérgico corticoestriatal em regular o processamento executivo está bem conhecido. A tarefa utilizada neste estudo para avaliar a flexibilidade comportamental e a capacidade dos animais em manter a atenção (*attentional set-shifting*) depende tanto do EST (Floresco, Ghods-Sharifi *et al.*, 2006) quanto do CPF (Floresco, Magyar *et al.*, 2006). No entanto, a via dopaminérgica mesocortical também pode modular outras funções executivas (Floresco e Magyar, 2006). Por exemplo, o desempenho de animais em tarefas que envolvem memória de trabalho pode ser controlado pela atividade dos receptores  $D_1$ , a qual obedece a uma “curva em U invertido”, em que o bloqueio ou a estimulação excessiva dos receptores  $D_1$  no CPF prejudicam o desempenho nesta tarefa (Zahrt, Taylor *et al.*, 1997; Romanides, Duffy *et al.*, 1999). De maneira correlata, se os níveis de DA no CPF estão baixos a estimulação dos receptores  $D_1$  pode melhorar a memória de trabalho (Floresco e Phillips, 2001; Chudasama e Robbins, 2004). Além disso, foi demonstrado que os receptores  $D_1$ ,  $D_2$  e  $D_4$  da via mesocortical também participam da tomada de decisão em ratos (Floresco e Magyar 2006). Em relação às regiões do EST, os dados mostram que o NAC *core* está envolvido na capacidade dos animais em adquirir e manter novas estratégias comportamentais enquanto que a porção *shell* medeia a aprendizagem sobre estímulos irrelevantes (Floresco, Ghods-Sharifi *et al.*, 2006). Em outras palavras, a porção *core* medeia as funções necessárias para completar a tarefa utilizada neste trabalho (*attentional set shifting*) enquanto que a porção *shell* está envolvida nos efeitos gratificantes da recompensa; de tal modo que a inativação da porção *shell* melhora o desempenho dos animais nesta tarefa (Floresco, Ghods-Sharifi *et al.*, 2006). Deve ser lembrado que a aquisição e a manutenção de novas estratégias comportamentais são controladas por uma ação cooperativa dos receptores  $D_1$  e  $D_2$  (Floresco e Magyar 2006). De acordo com esse conjunto de evidências, os animais SHR, que possuem baixo desempenho “executivo”, no presente estudo, apresentam alterações na densidade de receptores de DA no EST e no CPF (Figura 22). Os resultados mostram que os receptores  $D_1$  estão altamente

expressos em terminais nervosos do EST e do CPF de ratos SHR (Figura 22A e C); já os receptores  $D_2$  estão presentes em altas densidades apenas em terminais do CPF, mas não em terminais do EST de ratos SHR (Figura 22B e D). Esses resultados estão de acordo com as características neurobiológicas da linhagem SHR descritas previamente na Introdução. Apesar da sabida interação entre os receptores de DA e de AD, existem poucos dados sobre a influência do tratamento crônico com cafeína na densidade de receptores de DA durante a adolescência. Nas condições experimentais do presente estudo, o tratamento com cafeína não alterou a densidade de receptores  $D_1$  e  $D_2$  em sinaptossomas do EST ou do CPF das duas linhagens. Estes resultados são similares aos obtidos por Shi, Nikodijevic e colegas (1993), os quais mostram que o consumo crônico de cafeína (100 mg/kg/dia) na idade adulta não altera os níveis de receptores  $D_1$  e  $D_2$  no EST. Da mesma maneira, outro estudo mostrou que o tratamento crônico com cafeína não modifica o número ou a afinidade de receptores  $D_2$ , no EST e no CPF (Powell, Iuvone *et al.*, 2001). Contudo, neste estudo foi encontrada uma diminuição no EST, e um aumento no CPF, da densidade de receptores  $D_1$ . Assim, os prejuízos cognitivos e motores dos ratos SHR podem ser resultantes de diversas alterações no sistema dopaminérgico (densidade de receptores, DAT e captação de DA) e os efeitos benéficos da cafeína parecem estar mais relacionados com o aumento da disponibilidade de DA (normalização de DAT e captação de DA).

Contudo, deve ainda ser mencionado que, no presente estudo, os mesmo animais avaliados nos testes comportamentais foram utilizados para as análises neuroquímicas. Desta forma, todos os animais passaram por um período de restrição alimentar durante a adolescência para o cumprimento das tarefas comportamentais. A restrição alimentar pode induzir alterações nos receptores  $D_1$  e  $D_2$  do EST (Carr, Tsimberg *et al.*, 2003; Haberny e Carr, 2005) e, portanto, influenciar nas possíveis adaptações produzidas pelo tratamento com cafeína. Logo, as conseqüências neuroquímicas do tratamento crônico com cafeína durante a adolescência sem a eventual interferência da restrição alimentar devem ser esclarecidas em experimentos futuros. Além da densidade de receptores, outros mecanismos, tais como o acoplamento da proteína G aos receptores da DA e a afinidade destes receptores, também podem ser influenciados pelo tratamento crônico com cafeína.

Importantes modificações sobre a transmissão dopaminérgica foram observadas para os níveis de DAT (Figura 23) e para a captação de DA (Figura 24) após o tratamento crônico com cafeína.

Primeiramente, estes dados confirmam estudos prévios (Roessner, Sagvolden *et al.*; Russell, 2007) que mostram um aumento na densidade de DAT e na captação de DA, tanto em terminais do EST quanto do CPF, de ratos SHR em comparação a ratos WKY. Os resultados mostram, de maneira inédita, que o tratamento com cafeína reduziu os níveis de DAT a captação aumentada de DA em ambas as áreas cerebrais avaliadas de ratos SHR, sugerindo uma normalização da hipofunção dopaminérgica corticoestriatal de ratos SHR. Da mesma forma que ocorre para os receptores de DA, ainda não existem evidências de como o tratamento com cafeína durante a adolescência influencia a atividade ou densidade de DAT. Contudo, o DAT, que está exclusivamente expresso em neurônios dopaminérgicos (Ciliax, Heilman *et al.*, 1995; Kuhar, Vaughan *et al.*, 1998), é um dos principais reguladores da concentração sináptica de DA (Giros, Jaber *et al.*, 1996). A captação de DA ao terminal pré-sináptico mediada pelo DAT encerra as ações sinápticas da DA em seus receptores, logo a atividade do DAT determina a intensidade, duração e amplitude da transmissão dopaminérgica. Diversas proteínas pré-sinápticas como receptores e segundos mensageiros intracelulares podem controlar a função do DAT e, conseqüentemente, a transmissão dopaminérgica (Meiergerd, Patterson *et al.*, 1993; Mayfield e Zahniser, 2001; Granas, Ferrer *et al.*, 2003; Mortensen e Amara, 2003; Bolan, Kivell *et al.*, 2007; Zapata, Kivell *et al.*, 2007; Mortensen, Larsen *et al.*, 2008). A atividade do DAT também pode ser regulada por fosforilação (Khoshbouei, Sen *et al.*, 2004); o que pode ser particularmente interessante nos efeitos crônicos da cafeína, uma vez que a ativação dos receptores A<sub>2A</sub> estimula a formação de AMPc (Fredholm, Ap *et al.*, 2001).

Os DAT podem ser os principais responsáveis pela hipoatividade dopaminérgica em indivíduos com TDAH, uma vez que não foram encontradas associações entre a enzima limitante da síntese de DA, TH, e o TDAH (Comings, 1995; Barr, Wigg *et al.*, 2000; Payton, Holmes *et al.*, 2001). Os resultados do presente estudo concordam os dados obtidos em humanos, em outras palavras, não foram observadas diferenças na densidade de TH entre os animais controles das linhagens WKY e SHR (Figura 25). E sob as condições de tratamento do presente estudo, a cafeína não interferiu nos níveis da TH no EST e no CPF dos ratos de ambas as linhagens. Resultados anteriores (Leo, Sorrentino *et al.*, 2003) mostraram que os níveis de TH em neurônios do mesencéfalo de ratos SHR estão diminuídos apenas durante a primeira semana do desenvolvimento pós-natal (PN5 e PN7),

mas resta saber se essa alteração transitória participa das modificações dopaminérgicas vistas nestes animais. No mesmo sentido, outro trabalho mostrou que a expressão gênica e a densidade de TH, tanto no EST quanto no CPF, de ratos SHR são similares às encontradas nos ratos WKY (Li, Lu *et al.*, 2007). Entretanto, somente um trabalho encontrou resultados opostos, isto é, preparações do EST de ratos SHR apresentaram uma elevada expressão da TH em relação aos WKY (Roessner, Sagvolden *et al.*, 2010). De qualquer forma, torna-se evidente que a neurobiologia do TDAH, mesmo com os recentes avanços, permanece desconhecida, principalmente durante a intensa maturação que o cérebro passa durante a infância e adolescência.

Recentemente foi demonstrado, com o auxílio da ressonância magnética nuclear, que a cafeína melhora a memória de trabalho, em indivíduos normais, atuando em diferentes regiões do CPF, especificamente nas porções associadas à atenção (Koppelstaetter, Poeppel *et al.*, 2008). Os dados do presente estudo reforçam a participação dos receptores de AD nas funções executivas, uma vez que os animais SHR, além de apresentarem uma melhora em resposta ao tratamento com cafeína, possuem terminais nervosos do CPF com elevada densidade de receptores A<sub>2A</sub> em comparação aos animais WKY (Figura 26). Além disso, o tratamento com cafeína diminuiu significativamente os níveis de receptores A<sub>2A</sub> no EST de forma seletiva para a linhagem SHR. A idéia de que os elevados níveis de receptores A<sub>2A</sub> no CPF de ratos SHR participem do controle executivo vai de encontro com evidências prévias (Gimenez-Llort, Schiffmann *et al.*, 2007). Estes autores desenvolveram uma linhagem de ratos que possuem uma expressão aumentada de receptores A<sub>2A</sub> em regiões corticais; estes animais não apresentam alterações motoras, mas têm um baixo desempenho em tarefas que necessitam da memória de trabalho.

Os neurônios glutamatérgicos piramidais e os interneurônios gabaérgicos do CPF são fundamentais para a sincronização do funcionamento executivo (Rao, Williams *et al.*, 2000; Constantinidis e Goldman-Rakic, 2002). Neste contexto, as evidências indicam que a transmissão glutamatérgica em fatias do CPF de ratos SHR é mais responsiva do que de ratos WKY (Russell e Wiggins, 2000; Russell, 2001). E alterações na atividade dos receptores NMDA foram observadas no CPF de ratos SHR (Lehohla, Kellaway *et al.*, 2004; Lehohla, Russell *et al.*, 2004). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram essas evidências, como observado pela alta imunoreatividade de um marcador de terminais glutamatérgicos (Figura

27) no CPF de ratos SHR. Os receptores  $A_{2A}$  regulam a transmissão excitatória corticoestriatal (Norenberg, Wirkner *et al.*, 1997; Norenberg, Wirkner *et al.*, 1998; Gerevich, Wirkner *et al.*, 2002; Wirkner, Gerevich *et al.*, 2004). Contudo, a interação dos receptores de AD com a modulação dos sistemas gabaérgicos e glutamatérgicos no CPF e no EST, sobretudo nas vias relacionadas ao controle motor, tem sido amplamente estudada com enfoque na doença de Parkinson (Ferre, Ciruela *et al.*, 2007; Cunha, Ferre *et al.*, 2008). Embora os animais SHR apresentem elevados níveis de receptores  $A_{2A}$  no CPF e o tratamento com cafeína diminua a densidade destes receptores no EST (Figura 26), os resultados sugerem que não existem diferenças significantes na densidade de receptores  $A_{2A}$  em terminais gabaérgicos ou glutamatérgicos do circuito corticoestriatal entre as duas linhagens (Figura 27).

Contudo, os receptores  $A_{2A}$  podem orquestrar a transmissão sináptica de diversas maneiras, inclusive pela formação de dímeros com outros receptores (Carriba, Ortiz *et al.*, 2007; Fuxe, Marcellino *et al.*, 2008). Como discutido anteriormente, a co-localização dos receptores  $A_{2A}$ -D<sub>2</sub> está aumentada no EST (Fink, Weaver *et al.*, 1992) e tem sido frequentemente relacionada não só com aspectos motores, mas também motivacionais (Ferre, Diamond *et al.*, 2007; Worden, Shahriari *et al.*, 2009). Os dados do presente trabalho mostram que os receptores  $A_{2A}$  estão co-localizados com os DAT em terminais pré-sinápticos do EST e do CPF nas duas linhagens (Figura 28). Em concordância com os altos níveis de receptores  $A_{2A}$  no EST, o percentual de co-localizações  $A_{2A}$ -DAT foi maior no EST do que no CPF. Além disso, foi claramente observado, no EST, que os animais SHR apresentam menos receptores  $A_{2A}$  co-localizados com DAT em comparação aos animais WKY. Estes resultados sugerem que os receptores  $A_{2A}$  podem controlar diretamente a transmissão dopaminérgica por co-existirem com os DAT. Se esta premissa for verdadeira, algumas especulações podem ser feitas. Por exemplo, o caso de uma interação antagônica entre  $A_{2A}$ -DAT explicaria a co-localização diminuída no EST dos SHR em comparação aos WKY; ou seja, os receptores  $A_{2A}$ , estando menos co-localizados com os DAT, exerceriam um menor controle inibitório sobre os DAT, aumentando a captação de DA e favorecendo assim a hipoatividade dopaminérgica. Porém, isso não explicaria os efeitos farmacológicos da cafeína, ou seja, o antagonismo dos receptores  $A_{2A}$  estaria retirando o controle inibitório destes receptores sobre os DAT, aumentando a captação de DA. Mas, mesmo as conhecidas interações antagônicas  $A_{2A}$ -D<sub>2</sub> podem se tornar

sinérgicas em situações específicas, como no uso repetido de cocaína (ver em Ferré, Quiroz *et al.*, 2008). Portanto, primeiramente outras técnicas moleculares precisam ser empregadas para saber como ocorre à possível interação A<sub>2A</sub>-DAT; p. ex, utilizando abordagens de transferência de energia por ressonância de bioluminescência ou de fluorescência para observar se essas proteínas estão fisicamente ligadas. Obviamente, os resultados que mostram uma menor co-localização de A<sub>2A</sub>-DAT induzem a pensar que esta interação pode ter papel crucial nos desajustes comportamentais observados na linhagem SHR e nos indivíduos com TDAH.

Neste contexto, o avanço científico tem mostrado que o TDAH possui uma etiologia muito complexa, que vai muito além da hipofunção dopaminérgica. Recentemente, a busca por genes candidatos tem identificado importantes associações entre polimorfismos na SNAP-25 e a susceptibilidade ao TDAH (Zhang, Zhu *et al.* 2010; Gizer, Ficks *et al.*, 2009). A SNAP-25 é uma proteína de membrana, localizada na pré-sinapse, que controla a exocitose de neurotransmissores; de modo que a expressão alterada de SNAP-25 pode prejudicar a função neuronal (Horikawa, Saisu *et al.*, 1993; Sollner, Bennett *et al.*, 1993; Sollner, Whiteheart *et al.*, 1993). Na verdade, as primeiras evidências da SNAP-25 no TDAH surgiram com os camundongos mutantes *coloboma*, os quais exibem o fenótipo de hiperatividade e uma expressão de SNAP-25 diminuída, em aproximadamente 50%, por todo o SNC (Hess, Collins *et al.*, 1996). A SNAP-25 parece ter um papel fundamental na manifestação da hiperatividade, uma vez que o restabelecimento dos níveis de SNAP-25 resulta na normalização da atividade motora (Hess, Collins *et al.*, 1996). Nas condições do presente estudo, nenhuma diferença na densidade de SNAP-25 foi observada em função do tratamento com cafeína ou entre as linhagens WKY e SHR nas duas estruturas (Figura 29A e C). Estes resultados estão em desacordo não somente com as evidências em humanos, mas também a um recente trabalho mostrando que os animais SHR apresentam uma expressão reduzida da SNAP-25 no CPF (Li, Wong *et al.*, 2009). Além disso, a sinaptofisina está situada na membrana das vesículas sinápticas e pode, desta forma, participar do funcionamento sináptico, controlando o conteúdo de neurotransmissor dentro das vesículas (Valtorta, Pennuto *et al.*, 2004). Embora existam poucas evidências mostrando uma associação da sinaptofisina e o TDAH, pelo menos um trabalho mostrou que o gene desta proteína pode contribuir para a hereditariedade do TDAH (Brookes, Knight *et al.*, 2005). Acredita-se que os níveis de



sinaptofisina no CPF, e também no hipocampo, estejam relacionados com prejuízos na memória de reconhecimento espacial (Prediger, Franco *et al.*, 2007). Contudo, neste estudo, parece que o baixo desempenho cognitivo dos ratos SHR não está relacionado com a densidade de sinaptofisina no EST ou no CPF (Figura 29B e D). Novamente, a restrição alimentar pode ser uma limitação na interpretação dos resultados obtidos também para SNAP-25 e sinaptofisina. Foi demonstrado que a restrição alimentar, mesmo durante a idade adulta, pode aumentar os níveis e a taxa de renovação da sinaptofisina no córtex cerebral (Loncarevic-Vasiljkovic, Pesic *et al.*, 2009). Além disso, acredite-se que a restrição alimentar pode estimular a formação de novos neurônios e aumentar a plasticidade sináptica (Mattson, 2000; Fontan-Lozano, Lopez-Lluch *et al.*, 2008).

Conforme foi apresentado na Introdução, os receptores CB<sub>1</sub> estão vinculados a uma série de mecanismos transducionais e tornam-se, desta forma, decisivos na modulação da função sináptica. Estes receptores estão localizados na pré-sinapse e, de maneira geral, a sua ativação inibe a transmissão sináptica de diferentes sistemas, tais como o gabaérgico e o glutamatérgico (Kofalvi, Rodrigues *et al.*, 2005). Assim, o sistema canabinóide controla várias funções comportamentais, incluindo a ingestão de alimentos (Di Marzo e Matias, 2005), nocicepção (Cravatt e Lichtman, 2004), bem como efeitos motivacionais de drogas de abuso (De Vries e Schoffelmeer, 2005; Pandolfo, Vendruscolo *et al.*, 2009). O sistema canabinóide tem sido extensivamente estudado em processos mnemônicos de aquisição, consolidação e extinção (Marsicano, Wotjak *et al.*, 2002; Riedel e Davies, 2005; Takahashi, Pamplona *et al.*, 2005; Pamplona, Prediger *et al.*, 2006; Pamplona e Takahashi, 2006; Robinson, Goonawardena *et al.*, 2007). Recentemente, houve um aumento no interesse do sistema canabinóide sobre as funções executivas, incluindo atenção e flexibilidade comportamental (Pattij, Wiskerke *et al.*, 2008). Em relação à atenção, a administração aguda (Arguello e Jentsch, 2004) ou crônica (Verrico, Jentsch *et al.*, 2004) de agonistas canabinóides prejudica o desempenho em tarefas que exigem atenção visual. Analogamente, o antagonismo dos receptores CB<sub>1</sub> pode melhorar a atenção dos animais (Pattij, Janssen *et al.*, 2007). No mesmo sentido, os resultados do presente estudo mostram pela primeira vez que os animais SHR possuem uma densidade aumentada de receptores CB<sub>1</sub> no CPF em relação aos animais WKY (Figura 30), sugerindo que um funcionamento exagerado dos receptores CB<sub>1</sub> pode estar relacionado

com prejuízos na atenção. Isto está reforçado pelo fato de que os animais SHR tratados cronicamente com cafeína não tiveram prejuízos na atenção avaliada pelo *attentional set-shifting* os níveis de receptores CB<sub>1</sub> no CPF foram normalizados após o tratamento. Possivelmente, nos próximos anos, a investigação dos receptores CB<sub>1</sub> no TDAH atrairá mais esforços; até o momento, apenas um trabalho encontrou variações do gene para receptores CB<sub>1</sub> em pacientes com TDAH (Onaivi, 2009). Deve ainda ser lembrado que os receptores A<sub>2A</sub> estão presentes em altas densidades no EST e podem formar dímeros com os receptores CB<sub>1</sub> ou D<sub>2</sub> (Carriba, Ortiz *et al.*, 2007; Ferre, Quiroz *et al.*, 2008).

A impulsividade é um fenômeno comportamental caracterizado por uma predisposição para reações rápidas e não planejadas, tornando-se patológica em indivíduos com TDAH ou com dependência às drogas. A coerência de que a impulsividade participa destes transtornos pode ser vista em termos neuroanatômicos e farmacológicos. O CPF e o EST são as principais estruturas responsáveis pelo comportamento impulsivo (Winstanley, Theobald *et al.*, 2006). O sistema dopaminérgico tem papel fundamental na impulsividade, de tal modo que drogas como o MFD ou agonistas dopaminérgicos podem diminuir o descontrole impulsivo (Van Gaalen, Van Koten *et al.*, 2006). Além disso, as evidências sugerem que os receptores de AD também estão envolvidos no comportamento impulsivo, provavelmente pela interação com os receptores de DA, uma vez que o tratamento com cafeína diminui a impulsividade de animais testados em gaiolas de condicionamento operante (Barbelivien, Billy *et al.*, 2008; Diller, Saunders *et al.*, 2008).

Os resultados da Figura 31 confirmam os traços impulsivos da linhagem SHR, uma vez que a preferência à recompensa maior caiu de aproximadamente 80% (B) para 25% (C) quando um atraso de 15 segundos foi introduzido antes da entrega da recompensa maior. Além disso, as doses agudas de cafeína testadas no presente estudo (2 e 5 mg/kg, i.p.) não modificaram o percentual de escolhas à recompensa maior (Figura 31D), sugerindo que a cafeína, nestas doses, não alteram a escolha impulsiva em animais SHR. Estes resultados estão de acordo com os estudos citados anteriormente (Barbelivien, Billy *et al.*, 2008; Diller, Saunders *et al.*, 2008), os quais também mostram que doses inferiores a 10 mg/kg não alteram o comportamento impulsivo. Assim, uma potencial contribuição para o estudo da impulsividade pode estar nos efeitos da associação de baixas doses de cafeína com MFD; ou ainda, em experimentos que avaliem os efeitos do tratamento crônico com cafeína durante o período da adolescência, dada a normalização da

densidade de DAT e da captação de DA vistas, pela primeira vez, no presente estudo. Deve ser mencionado que a impulsividade pode ser mensurada em uma variedade de testes (Evenden, 1999). No presente estudo, a medida impulsiva avaliada pode ser usada tanto em humanos como em roedores e se refere à capacidade dos animais em manter o “autocontrole” perante a entrega de uma recompensa demorada.

A participação do sistema canabinóide sobre a impulsividade tem sido confirmada por achados clínicos, em indivíduos saudáveis, o <sup>9</sup>-THC pode prejudicar diferentes formas do comportamento impulsivo (McDonald, Schleifer *et al.*, 2003; Ramaekers, Kauert *et al.*, 2006). Da mesma forma, a administração do agonista CB1 WIN prejudicou o “autocontrole” dos animais SHR, como indicado pela diminuição no percentual de escolhas à recompensa maior e demorada (Figura 31D), sugerindo um aumento deste traço impulsivo. Já o antagonista CB1 AM na dose de 0,25 mg/kg não modificou a impulsividade dos animais SHR. Embora a administração de cafeína também não tenha alterado o perfil impulsivo dos SHR, ela foi capaz de impedir o aumento da impulsividade induzido pelo WIN. Este efeito pode ser particularmente interessante na relação entre o TDAH e dependência de drogas. Considerando que os derivados canabinóides podem agravar os sintomas do TDAH (Fergusson e Boden, 2008) e o aumento da impulsividade pode constituir um fator de risco para o consumo descontrolado de drogas, os efeitos da cafeína são promissores no sentido de impedir a formação deste ciclo vicioso.

Assim como o TDAH, a dependência às drogas está caracterizada pelo desequilíbrio de sistemas neurais envolvidos na motivação (Koob e Nestler, 1997; Robinson e Berridge, 2000) e no controle executivo sobre o comportamento relacionado à recompensa (Jentsch e Taylor, 1999). Em termos moleculares, o gene que codifica o DAT possui um polimorfismo que tem sido repetidamente associado ao TDAH (Gill, Daly *et al.*, 1997; Swanson, Flodman *et al.*, 2000; Roman, Schmitz *et al.*, 2001; Cornish, Manly *et al.*, 2005) e, recentemente, com o abuso de cocaína e tabaco (Guindalini, Howard *et al.*, 2006; Stapleton, Sutherland *et al.*, 2007). Contudo, os derivados canabinóides ocupam o primeiro lugar no consumo de drogas ilícitas. Apesar desta preferência por canabinóides ser indiscutível em humanos, a aversão tem sido observada como o efeito predominante de canabinóides em modelos animais. Por exemplo, os canabinóides não produzem auto-administração (Leite e Carlini, 1974; Mansbach, Nicholson *et al.*, 1994), aumentam o limiar de auto-estimulação intracranial (Vlachou, Nomikos

*et al.*, 2005) e induzem aversão condicionada ao lugar (Mcgregor, Issakidis *et al.*, 1996) em roedores. Os resultados do presente estudo fornecem novas evidências que um agonista canabinóide pode produzir respostas opostas em ratos SHR e Wistar, mesmo sob condições experimentais idênticas. Em ratos da linhagem Wistar, considerados como uma população “normal” uma vez que os indivíduos são geneticamente diferentes entre si, o agonista CB<sub>1</sub> WIN produziu aversão ao lugar. Em contraste, na linhagem SHR, o WIN produziu efeitos reforçadores, como indicado pelo aumento da PCL (Figura 32A). Além disso, os dados sugerem que tanto o efeito aversivo como o reforçador do WIN estão mediados pelos receptores CB<sub>1</sub>, pois o tratamento prévio com AM251, um antagonista seletivo dos receptores CB<sub>1</sub>, preveniu a aquisição ou a aversão da PCL (Figura 32B e C). O conjunto de resultados sugere que a alta densidade dos receptores modulatórios CB<sub>1</sub> e A2A no CPF, aliada ao aumento da impulsividade induzido pelo WIN, e a falta de controle executivo sobre os aspectos motivacionais dos ratos SHR aumentam a sensibilidade aos efeitos reforçadores de canabinóides e, possivelmente de outras drogas.

Outra limitação que deve ser questionada se refere à possível interferência da hipertensão nos comportamentos exibidos pelos animais SHR. Os resultados do presente estudo indicam uma dissociação entre os efeitos comportamentais do WIN e a pressão arterial (Figura 33). Primeiro, os dados confirmam que os ratos SHR adolescentes ainda não desenvolveram hipertensão, como indicado pela pressão arterial média similar aos animais normotensos Wistar. Segundo, como esperado, os ratos SHR adultos possuem uma elevada pressão arterial média em relação aos adolescentes ou aos ratos Wistar nas duas faixas etárias. Terceiro, a administração de WIN na dose que produziu PCL (0,25 mg/kg; i.p.) em ratos SHR não alterou a pressão arterial destes animais. Somente uma dose de WIN 5 vezes maior (1,25 mg/kg; i.p.) causou um efeito hipotensivo nos animais SHR adultos. Entretanto, a influência da pressão arterial sobre os efeitos comportamentais do WIN não pode ser completamente descartada porque estudos anteriores mostraram que os canabinóides possuem claros efeitos cardiovasculares em ratos normotensos e em SHR (Lake, Compton *et al.*, 1997; Batkai, Pacher *et al.*, 2004; Wheal, Bennett *et al.*, 2007). Além disso, embora se acredite que a hipertensão seja um efeito adverso da cafeína (Daly, 2007; Riksen, Rongen *et al.*, 2009), dados anteriores mostraram que o tratamento crônico durante a adolescência não altera a pressão arterial em ratos SHR (Pires, Pamplona *et al.*, 2010). Contudo, estes resultados e os do

presente estudo foram obtidos em animais anestesiados e, portanto, mais estudos utilizando animais conscientes são necessários para dissociar as respostas comportamentais dos ratos SHR da hipertensão. Obviamente, uma proposta adequada para o estudo do TDAH em ratos SHR pode ser a utilização dos animais durante o período da infância e adolescência; não somente por eliminar o fator da hipertensão, mas também pela incidência do transtorno ser maior neste período da vida.

Alguns pesquisadores defendem, algumas vezes de forma especulativa, que a cafeína induz dependência (Holtzman, 1990; Cspi, 2005). Contudo, o consumo de cafeína não cumpre os critérios do DSM IV-TR para dependência (Satel, 2006). Além disso, a exposição diária a cafeína desenvolve tolerância a efeitos como o aumento da ansiedade e a agitação, cujas bases moleculares desta tolerância foram discutidas anteriormente. Entretanto, os resultados da Figura 34A mostram que o condicionamento com cafeína, apenas na dose de 5 mg/kg (i.p.), induziu PCL em animais SHR. Na sessão de condicionamento da PCL, os animais receberam um total de 4 administrações de cafeína, uma a cada dois dias. Assim, os efeitos reforçadores da cafeína nesta dose podem estar relacionados com a falta de tolerância farmacológica frente às características dos animais SHR, tais como comportamento de risco, impulsividade e pela busca a novidade.

Na verdade, a ativação ou o antagonismo dos receptores de AD estão relacionados com diferentes aspectos da dependência às drogas, incluindo a motivação, emocionalidade e efeitos de retirada (Hack e Christie, 2003; Prediger, Batista *et al.*, 2004; Prediger, Da Silva *et al.*, 2006). O uso repetido de drogas causa diversas adaptações nos sistemas de transmissão, preferencialmente nas vias dopaminérgicas do EST e do CPF. Por exemplo, tem sido constantemente observado que drogas podem causar adaptações a longo-prazo na regulação da sinalização celular mediada pelo AMPc. A importância dos receptores de AD em modular esta sinalização, aliada a interação direta com os receptores e transportadores (Figura 28) de DA, os tornam alvos promissores para controlar ou tratar a dependência às drogas. Em relação ao canabinóides, Soria, Castane e colaboradores (2004) relataram que camundongos com eliminação gênica dos receptores  $A_{2A}$  são menos sensíveis aos efeitos reforçadores e aversivos de canabinóides e apresentam menos manifestações somáticas produzidas pela retirada do  $^9$ -THC. Da mesma maneira, o tratamento prévio com cafeína, em doses que produziram ou não efeitos reforçadores por si, impediram a aquisição de PCL produzida pelo WIN em ratos SHR (Figura 34). E os efeitos

reforçadores do WIN nos ratos SHR foram prevenidos por um antagonista  $A_{2A}$ , mas não por um antagonista  $A_1$ ; sugerindo que, nestas condições, as propriedades reforçadoras de canabinóides estão relacionadas aos receptores  $A_{2A}$ . Em combinação, os resultados mostram que além do antagonismo  $A_{2A}$ , a ativação dos receptores  $D_2$  impede a aquisição de PCL induzida pelo WIN. A modulação cooperativa entre os receptores  $A_{2A}$ - $D_2$  sobre as propriedades reforçadoras do WIN foi comprovada pela associação de um antagonista  $A_{2A}$  com agonista  $D_2$ , cujas doses eram ineficazes por si, em prevenir a aquisição de PCL induzida pelo WIN (Figura 35). Com base nestes resultados e nas interações em termos de sinalização intracelular compartilhadas pelos receptores  $A_{2A}$ ,  $D_2$  e  $CB_1$  (Yao, Fan *et al.*, 2003), os antagonistas  $A_{2A}$ , como a cafeína, podem atenuar de forma intrigante diversos problemas relacionados com a dependência às drogas. Por último, e baseado na normalização da densidade de DAT e captação de DAT causada pelo tratamento crônico com cafeína em SHR, o tratamento durante a adolescência foi capaz de prevenir a PCL induzida pelo WIN em ratos SHR (Figura 36).

Em conclusão, os resultados do presente estudo fornecem novas evidências do potencial terapêutico da cafeína no TDAH e na relação deste transtorno com o abuso de drogas. Primeiro, o tratamento crônico com cafeína durante a adolescência preveniu os prejuízos de atenção e de memória modelados pela linhagem SHR. Estes prejuízos parecem estar associados com uma hipofunção dopaminérgica, resultante de uma alta densidade de DAT e de captação de DA, a qual é normalizada pelo tratamento crônico com cafeína. Os resultados indicam ainda que a densidade aumentada de receptores  $A_{2A}$  e  $CB_1$  no CPF contribui para as características comportamentais observadas em ratos SHR. Além disso, os resultados sugerem que os receptores  $A_{2A}$  podem controlar diretamente a disponibilidade sináptica de DA por co-existirem com os DAT. Segundo, a administração de um agonista canabinóide em ratos SHR induz efeitos reforçadores e aumenta a impulsividade, os quais são impedidos pela administração prévia de cafeína ou de um antagonista seletivo  $A_{2A}$ . Os resultados do presente estudo encorajam estudos adicionais para investigar o valor terapêutico da cafeína em pacientes com TDAH, tanto do ponto de vista cognitivo quanto da modulação do controle executivo sobre os comportamentos relacionados ao abuso de drogas.

## 6. REFERÊNCIAS

- ADRIANI, W. et al. The spontaneously hypertensive-rat as an animal model of ADHD: evidence for impulsive and non-impulsive subpopulations. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 7, p. 639-51, Nov 2003.
- ANDERSEN, S. L. et al. Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 1, p. 13-4, Jan 2002.
- ANDERSEN, S. L.; DUMONT, N. L.; TEICHER, M. H. Developmental differences in dopamine synthesis inhibition by (+/-)-7-OH-DPAT. **Naumyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 356, n. 2, p. 173-81, Aug 1997.
- ANTONIOU, K. et al. A detailed behavioral analysis of the acute motor effects of caffeine in the rat: involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Psychopharmacology (Berl)**, v.183, n.2, p.154-62, Dec 2005.
- ARGUELLO, P. A.; JENTSCH, J.D. Cannabinoid CB1 receptor-mediated impairment of visuospatial attention in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v.177, n.1-2, p.141-50, Dec 2004.
- ARIAS-CARRION, O.; POPPEL, E. Dopamine, learning, and reward-seeking behavior. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 67, n. 4, p. 481-8, 2007.
- ARNETT, J. J.; OFFER, D.; FINE, M. A. Reckless driving in adolescence: 'state' and 'trait' factors. **Accid Anal Prev**, v. 29, n. 1, p. 57-63, Jan 1997.
- ARNOLD, L. E. et al. Methylphenidate vs dextroamphetamine vs caffeine in minimal brain dysfunction: controlled comparison by placebo washout design with Bayes' analysis. **Arch Gen Psychiatry**, v.35, n.4, p.463-73, Apr 1978.
- BALLARIN, M. et al. Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. **Acta Physiol Scand**, v.142, n.1, p.97-103, May 1991.
- BANASCHEWSKI, T. et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. **Eur Child Adolesc Psychiatry**, v. 19, n. 3, p. 237-57, Mar 2010.
- BARBELIVIEN, A. et al. Rats with different profiles of impulsive choice behavior exhibit differences in responses to caffeine and d-amphetamine and in medial prefrontal cortex 5-HT utilization. **Behav Brain Res**, v.187, n.2, p.273-83, Mar 2008.

BARDO, M. T. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. **Crit Rev Neurobiol**, v. 12, n. 1-2, p. 37-67, 1998.

BARONE, J. J.; ROBERTS, H. R. Caffeine consumption. **Food Chem Toxicol**, v. 34, n. 1, p. 119-29, Jan 1996.

BARR, C. L. et al. Further evidence from haplotype analysis for linkage of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. **Am J Med Genet**, v.96, n.3, p.262-7, Jun 2000.

BATKAI, S. et al. Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. **Circulation**, v.110, n.14, p.1996-2002, Oct 2004.

BELTRAMO, M. et al. Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. **J Neurosci**, v. 20, n. 9, p. 3401-7, May 1 2000.

BHATTACHARYA S. K. et al. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. **J Psychopharmacol**, v.11, n.3, p.219-24. 1997.

BIDAUT-RUSSELL, M.; DEVANE, W. A.; HOWLETT, A. C. Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. **J Neurochem**, v. 55, n. 1, p. 21-6, Jul 1990.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S. V. Current concepts on the neurobiology of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **J Atten Disord**, v. 6 Suppl 1, p. S7-16, 2002.

BIEDERMAN, J. et al. Psychoactive substance use disorders in adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): effects of ADHD and psychiatric comorbidity. **Am J Psychiatry**, v. 152, n. 11, p. 1652-8, Nov 1995.

BIZOT, J. C. et al. Effects of imipramine-like drugs and serotonin uptake blockers on delay of reward in rats. Possible implication in the behavioral mechanism of action of antidepressants. **J Pharmacol Exp Ther**, v.246, n.3, p.1144-51, Sep 1988.

BOIX, F. et al. Chronic L-deprenyl treatment alters brain monoamine levels and reduces impulsiveness in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Behav Brain Res**, v. 94, n. 1, p. 153-62, Jul 1998.



BOLAN, E. A. et al. D2 receptors regulate dopamine transporter function via an extracellular signal-regulated kinases 1 and 2-dependent and phosphoinositide 3 kinase-independent mechanism. **Mol Pharmacol**, v.71, n.5, p.1222-32, May 2007.

BRESSAN, R. A.; CRIPPA, J. A. The role of dopamine in reward and pleasure behaviour--review of data from preclinical research. **Acta Psychiatr Scand Suppl**, n. 427, p. 14-21, 2005.

BROOKES, K. J. et al. DNA pooling analysis of ADHD and genes regulating vesicle release of neurotransmitters. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v.139B, n.1, p.33-7, Nov 2005.

BROWN, R. M.; SHORT, J. L. Adenosine A(2A) receptors and their role in drug addiction. **J Pharm Pharmacol**, v. 60, n. 11, p. 1409-30, Nov 2008.

BRUCE, M. S. The anxiogenic effects of caffeine. **Postgrad Med J**, v.66 Suppl 2, p.S18-24. 1990.

BUSH, G. Attention-deficit/hyperactivity disorder and attention networks. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 278-300, Jan 2010.

Caffeine: a model drug of abuse. NIDA Res Monogr, v.162, p.73-5. 1996.

CAILHOL, S.; MORMEDE, P. Sex and strain differences in ethanol drinking: effects of gonadectomy. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 4, p. 594-9, Apr 2001.

\_\_\_\_\_. Conditioned taste aversion and alcohol drinking: strain and gender differences. **J Stud Alcohol**, v. 63, n. 1, p. 91-9, Jan 2002.

CANAS, P. M. et al. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **J Neurosci**, v.29, n.47, p.14741-51, Nov 2009.

CAREY, M. P. 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. **Behav Brain Res**, v. 94, n. 1, p. 173-85, Jul 1998.

CARLEZON, W. A., JR.; THOMAS, M. J. Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. **Neuropharmacology**, v. 56 Suppl 1, p. 122-32, 2009.

CARR, K. D. et al. Evidence of increased dopamine receptor signaling in food-restricted rats. **Neuroscience**, v.119, n.4, p.1157-67. 2003.

CARRIBA, P. et al. Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 11, p. 2249-59, Nov 2007.

CASEY, B. J. et al. Frontostriatal connectivity and its role in cognitive control in parent-child dyads with ADHD. **Am J Psychiatry**, v. 164, n. 11, p. 1729-36, Nov 2007.

CASEY, B. J.; GETZ, S.; GALVAN, A. The adolescent brain. **Dev Rev**, v. 28, n. 1, p. 62-77, 2008.

CASEY, B. J.; GIEDD, J. N.; THOMAS, K. M. Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. **Biol Psychol**, v. 54, n. 1-3, p. 241-57, Oct 2000.

CHAMBERS, R. A.; TAYLOR, J. R.; POTENZA, M. N. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. **Am J Psychiatry**, v. 160, n. 6, p. 1041-52, Jun 2003.

CHERKASOVA, M. V.; HECHTMAN, L. Neuroimaging in attention-deficit hyperactivity disorder: beyond the frontostriatal circuitry. **Can J Psychiatry**, v. 54, n. 10, p. 651-64, Oct 2009.

CHIAVEGATTO, S. et al. Expression of alpha-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. **Mol Psychiatry**, v. 14, n. 9, p. 894-905, Sep 2009.

CHUDASAMA, Y.; Robbins, T.W. Psychopharmacological approaches to modulating attention in the five-choice serial reaction time task: implications for schizophrenia. **Psychopharmacology (Berl)**, v.174, n.1, p.86-98, Jun 2004.

CILIAUX, B. J. et al. The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. **J Neurosci**, v.15, n.3, p.1714-23, Mar 1995.

CIRUELA, F. et al. Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): Behind the biology of adenosine signaling. **Biochim Biophys Acta**, v.1798, n.1, p.9-20 Jan 2010.

CIRUELA, F. et al. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. **J Neurosci**, v.26, n.7, p.2080-7, Feb 2006.

CLARK, D. B.; KIRISCI, L.; MOSS, H. B. Early adolescent gateway drug use in sons of fathers with substance use disorders. **Addict Behav**, v. 23, n. 4, p. 561-6, Jul-Aug 1998.

COMINGS, D. E. The role of genetic factors in conduct disorder based on studies of Tourette syndrome and attention-deficit hyperactivity disorder probands and their relatives. **J Dev Behav Pediatr**, v.16, n.3, p.142-57, Jun 1995.

CONLAY, L. A. et al. Caffeine alters plasma adenosine levels. **Nature**, v.389, n.6647, p.136, Sep 1997.

CONNERS, C. K. The acute effects of caffeine on evoked response, vigilance, and activity level in hyperkinetic children. **J Abnorm Child Psychol**, v.7, n.2, p.145-51, Jun 1979.

CONSTANTINIDIS, C.; GOLDMAN-RAKIC, P.S. Correlated discharges among putative pyramidal neurons and interneurons in the primate prefrontal cortex. **J Neurophysiol**, v.88, n.6, p.3487-97, Dec 2002.

CORNISH, K. M. et al. Association of the dopamine transporter (DAT1) 10/10-repeat genotype with ADHD symptoms and response inhibition in a general population sample. **Mol Psychiatry**, v.10, n.7, Jul, p.686-98. 2005.

CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1670-2, Jun 4 1999.

CRAVATT, B. F.; LICHTMAN, A.H. The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. **J Neurobiol**, v.61, n.1, p.149-60, Oct 2004.

CSPI. Calls on FDA to Require Health Warnings on Sodas. 2005.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem Int**, v. 38, n. 2, p. 107-25, Feb 2001.

CUNHA, R. A.; AGOSTINHO, P.M. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. **J Alzheimers Dis**, v.20 Suppl 1, p.S95-116, 2010.

CUNHA, R. A. et al. Modification of A1 and A2a adenosine receptor binding in aged striatum, hippocampus and cortex of the rat. **Neuroreport**, v. 6, n. 11, p. 1583-8, Jul 31 1995.

\_\_\_\_\_. Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 15, p. 1512-24, 2008.

\_\_\_\_\_. Adenosine A2A receptors stimulate acetylcholine release from nerve terminals of the rat hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 196, n. 1-2, p. 41-4, Aug 18 1995.

\_\_\_\_\_. Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus. **Brain Res**, v. 649, n. 1-2, p. 208-16, Jun 27 1994.

\_\_\_\_\_. Excitatory and inhibitory effects of A1 and A2A adenosine receptor activation on the electrically evoked [3H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. **J Neurochem**, v. 63, n. 1, p. 207-14, Jul 1994.

DA SILVA, G. E.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N. Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 10, p. 1511-7, Oct 2004.

DA SILVA, G. E. et al. Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. **Braz J Med Biol Res**, v.37, n.10, p.1511-7, Oct 2004.

DA SILVA, G. E. et al. Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. **Life Sci**, v.77, n.6, p.693-706, Jun 24 2005.

DALBY, J. T. Will population decreases in caffeine consumption unveil attention deficit disorders in adults? **Med Hypotheses**, v.18, n.2, p.163-7, Oct 1985.

DALY, J. W. Caffeine analogs: biomedical impact. **Cell Mol Life Sci**, v.64, n.16, p.2153-69, Aug 2007.

DAVEY, C. G.; YUCEL, M.; ALLEN, N. B. The emergence of depression in adolescence: development of the prefrontal cortex and the representation of reward. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 1, p. 1-19, 2008.

DAVIDS, E. et al. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 42, n. 1, p. 1-21, Apr 2003.

DE BELLIS, M. D. et al. Sex differences in brain maturation during childhood and adolescence. **Cereb Cortex**, v. 11, n. 6, p. 552-7, Jun 2001.

DE VRIES, T. J.; SCHOFFELMEER, A.N. Cannabinoid CB1 receptors control conditioned drug seeking. **Trends Pharmacol Sci**, v.26, n.8, p.420-6, Aug 2005.

- DEBRY, G.; NEHLIG, A. [Coffee, source of performance or dependence?]. **Rev Infirm**, n. 1, p. 55-62, Jan 1994.
- DELLU, F., W. et al. A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. **Brain Res**, v.588, n.1, p.132-9, Aug 1992.
- DI MARZO, V.; MATIAS, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. **Nat Neurosci**, v.8, n.5, p.585-9, May 2005.
- DILLER, J. W. et al. Effects of acute and repeated administration of caffeine on temporal discounting in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v.89, n.4, p.546-55, Jun 2008
- DIXON, A. K. et al. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 6, p. 1461-8, Jul 1996.
- DOUGHERTY, D. D. et al. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. **Lancet**, v. 354, n. 9196, p. 2132-3, Dec 18-25 1999.
- DSM-IV-TR. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders American Psychiatric Association Washington DC, v.4<sup>o</sup> Edition. 2000.
- DUNKLEY, P. R. et al. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. **Nat Protoc**, v.3, n.11, p.1718-28. 2008.
- EFRON, D. et al. Side effects of methylphenidate and dexamphetamine in children with attention deficit hyperactivity disorder: a double-blind, crossover trial. **Pediatrics**, v.100, n.4, p.662-6, Oct 1997.
- EL YACOUBI, M. et al. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. **Br J Pharmacol**, v.129, n.7, p.1465-73, Apr 2000.
- EVANS, S. M.; GRIFFITHS, R.R. Caffeine tolerance and choice in humans. **Psychopharmacology (Berl)**, v.108, n.1-2, p.51-9. 1992.
- EVENDEN, J. L. Varieties of impulsivity. **Psychopharmacology (Berl)**, v.146, n.4, p.348-61, Oct 1999.
- EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 1481-9, Nov 2005.

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

FARERI, D. S.; MARTIN, L. N.; DELGADO, M. R. Reward-related processing in the human brain: developmental considerations. **Dev Psychopathol**, v. 20, n. 4, p. 1191-211, Fall 2008.

FAYYAD, J. et al. Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. **Br J Psychiatry**, v. 190, p. 402-9, May 2007.

FERGUSON, D. M.; BODEN, J. M. Cannabis use and adult ADHD symptoms. **Drug Alcohol Depend**, v. 95, n. 1-2, p. 90-6, May 1 2008.

FERRE, S. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. **Psychopharmacology (Berl)**, v.133, n.2, p.107-20, Sep 1997.

FERRE, S. et al. Role of adenosine in the control of homosynaptic plasticity in striatal excitatory synapses. **J Integr Neurosci**, v. 4, n. 4, p. 445-64, Dec 2005.

\_\_\_\_\_. Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. **ScientificWorldJournal**, v. 7, p. 74-85, 2007.

FERRE, S. et al. Adenosine A2A receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry implications for drug addiction, sleep and pain. **Prog Neurobiol**, v.83, n.5, p.332-47, Dec 2007.

\_\_\_\_\_. Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. **Neuroscience**, v. 63, n. 3, p. 765-73, Dec 1994.

\_\_\_\_\_. Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A1 and dopamine D1 receptors. **Neuroreport**, v. 6, n. 1, p. 73-6, Dec 30 1994.

\_\_\_\_\_. An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 15, p. 1468-74, 2008.

\_\_\_\_\_. Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 16, p. 7238-41, Aug 15 1991.

FIBIGER, H. C.; PHILLIPS, A. G. Mesocorticolimbic dopamine systems and reward. **Ann N Y Acad Sci**, v. 537, p. 206-15, 1988.

FILE, S. E. et al. Behavioral effects of acute and chronic administration of caffeine in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v.30, n.4, p.809-15, Aug 1988.

FINK, J. S. et al. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. **Brain Res Mol Brain Res**, v.14, n.3, p.186-95, Jul 1992.

FLORESCO, S. B. et al. Dissociable roles for the nucleus accumbens core and shell in regulating set shifting. **J Neurosci**, v.26, n.9, p.2449-57, Mar 2006.

FLORESCO, S. B.; MAGYAR, O. Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 188, n. 4, p. 567-85, Nov 2006.

FLORESCO, S. B. et al. Multiple dopamine receptor subtypes in the medial prefrontal cortex of the rat regulate set-shifting. **Neuropsychopharmacology**, v.31, n.2, p.297-309, Feb 2006.

FLORESCO, S. B.; PHILLIPS, S.G. Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D1 agonist into the rat medial prefrontal cortex. **Behav Neurosci**, v.115, n.4, p.934-9, Aug 2001.

FONTAN-LOZANO, A. et al. Molecular bases of caloric restriction regulation of neuronal synaptic plasticity. **Mol Neurobiol**, v.38, n.2, p.167-77, Oct 2008.

FRANCO, R. et al. Receptor-receptor interactions involving adenosine A1 or dopamine D1 receptors and accessory proteins. **J Neural Transm**, v. 114, n. 1, p. 93-104, Jan 2007

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 4, p. 527-52, Dec 2001.

\_\_\_\_\_. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 1, p. 83-133, Mar 1999.

FUXE, K. et al. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 26, n. 2-3, p. 258-73, May 1998.

FUXE, K. et al. Receptor-receptor interactions within receptor mosaics. Impact on neuropsychopharmacology. **Brain Res Rev**, v.58, n.2, p.415-52, Aug 2008.

GARFINKEL, B. D. et al. Individual responses to methylphenidate and caffeine in children with minimal brain dysfunction. **Can Med Assoc J**, v.113, n.8, p.729-32, Oct 1975a.

\_\_\_\_\_. Methylphenidate and caffeine in the treatment of children with minimal brain dysfunction. **Am J Psychiatry**, v.132, n.7, p.723-8, Jul 1975b.

\_\_\_\_\_. Responses to methylphenidate and varied doses of caffeine in children with attention deficit disorder. **Can J Psychiatry**, v.26, n.6, p.395-401, Oct 1981.

GASPAR, P.; BLOCH, B.; LE MOINE, C. D1 and D2 receptor gene expression in the rat frontal cortex: cellular localization in different classes of efferent neurons. **Eur J Neurosci**, v. 7, n. 5, p. 1050-63, May 1 1995.

GATHERCOLE, S. E. et al. The structure of working memory from 4 to 15 years of age. **Dev Psychol**, v. 40, n. 2, p. 177-90, Mar 2004.

GEREVICH, Z. et al. Adenosine A2A receptors inhibit the N-methyl-D-aspartate component of excitatory synaptic currents in rat striatal neurons. **Eur J Pharmacol**, v.451, n.2, p.161-4, Sep 2002.

GEVAERD, M. S. et al. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. **Brain Res Bull**, v.55, n.1, p.101-6, May 2001.

GILL, M. et al. Confirmation of association between attention deficit hyperactivity disorder and a dopamine transporter polymorphism. **Mol Psychiatry**, v.2, n.4, p.311-3, Jul 1997.

GIMENEZ-LLORT, L. et al. Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain. **Neurobiol Learn Mem**, v.87, n.1, p.42-56, Jan 2007.

GIROS, B. et al. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature**, v.379, n.6566, p.606-12, Feb 1996.

GIZER, I. R. et al. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. **Hum Genet**, v.126, n.1, p.51-90, Jul 2009.

GOMES, C. A. et al. GDNF control of the glutamatergic cortico-striatal pathway requires tonic activation of adenosine A receptors. **J Neurochem**, v. 108, n. 5, p. 1208-19, Mar 2009.



GOODWIN, D. W. et al. Alcoholism and the hyperactive child syndrome. **J Nerv Ment Dis**, v. 160, n. 5, p. 349-53, May 1975.

GRANAS, C. et al. N-terminal truncation of the dopamine transporter abolishes phorbol ester- and substance P receptor-stimulated phosphorylation without impairing transporter internalization. **J Biol Chem**, v.278, n.7, p.4990-5000, Feb 2003.

GREDEN, J. F. Anxiety or caffeinism: a diagnostic dilemma. **Am J Psychiatry**, v.131, n.10, p.1089-92, Oct 1974.

GREENHILL, L. L. et al. Impairment and deprimed responses to different methylphenidate doses in children with ADHD: the MTA titration trial. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v.40, n.2, p.180-7, Feb 2001.

GREYDANUS, D. E.; PATEL, D. R. The adolescent and substance abuse: current concepts. **Dis Mon**, v. 51, n. 7, p. 392-431, Jul 2005.

GRODZINSKY, G. M.; BARKLEY, R.A. Predictive power of frontal lobe tests in the diagnosis of attention deficit hyperactivity disorder. **Clin Neuropsychol**, v.13, n.1, p.12-21, Feb 1999.

GUINDALINI, C. et al. A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.12, p.4552-7, Mar 2006.

HABER, S. N.; FUDGE, J. L.; MCFARLAND, N. R. Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. **J Neurosci**, v. 20, n. 6, p. 2369-82, Mar 15 2000.

HABERNY, S. L.; Carr, K .D. Comparison of basal and D-1 dopamine receptor agonist-stimulated neuropeptide gene expression in caudate-putamen and nucleus accumbens of ad libitum fed and food-restricted rats. **Brain Res Mol Brain Res**, v.141, n.2, p.121-7, Nov 30 2005.

HACK, S. P.; CHRISTIE, R.J. Adaptations in adenosine signaling in drug dependence: therapeutic implications. **Crit Rev Neurobiol**, v.15, n.3-4, p.235-74. 2003.

HALLDNER, L. et al. Lack of tolerance to motor stimulant effects of a selective adenosine A(2A) receptor antagonist. **Eur J Pharmacol**, v.406, n.3, p.345-54, Oct 2000.

HARWOOD, R. H.; SAYER, A. A.; HIRSCHFELD, M. Current and future worldwide prevalence of dependency, its relationship to total population, and dependency ratios. **Bull World Health Organ**, v. 82, n. 4, p. 251-8, Apr 2004.

HEILIGENSTEIN, E. et al. Preliminary normative data on DSM-IV attention deficit hyperactivity disorder in college students. **J Am Coll Health**, v. 46, n. 4, p. 185-8, Jan 1998.

HENRY, D. J.; CHAVKIN, C. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. **Neurosci Lett**, v. 186, n. 2-3, p. 91-4, Feb 17 1995.

HESS, E. J. et al. Mouse model of hyperkinesia implicates SNAP-25 in behavioral regulation. **J Neurosci**, v.16, n.9, p.3104-11, May 1996.

HIGGINS, G. A. et al. The effect of caffeine to increase reaction time in the rat during a test of attention is mediated through antagonism of adenosine A2A receptors. **Behav Brain Res**, v.185, n.1, p.32-42, Dec 2007.

HILL, J. C.; SCHOENER, E. P. Age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder. **Am J Psychiatry**, v. 153, n. 9, p. 1143-6, Sep 1996.

HIMELSTEIN, J.; NEWCORN, J. H.; HALPERIN, J. M. The neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. **Front Biosci**, v. 5, p. D461-78, Apr 1 2000.

HOFFMAN, A. F.; LUPICA, C. R. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. **J Neurosci**, v. 20, n. 7, p. 2470-9, Apr 1 2000.

HOLTZMAN, S. G. Caffeine as a model drug of abuse. **Trends Pharmacol Sci**, v.11, n.9, p.355-6, Sep 1990.

HOOPER, C. J. et al. Adolescents' performance on the Iowa Gambling Task: implications for the development of decision making and ventromedial prefrontal cortex. **Dev Psychol**, v. 40, n. 6, p. 1148-58, Nov 2004.

HORIKAWA, H. P. et al. A complex of rab3A, SNAP-25, VAMP/synaptobrevin-2 and syntaxins in brain presynaptic terminals. **FEBS Lett**, v.330, n.2, p.236-40, Sep 1993.

HUESTIS, R. D. et al. Caffeine versus methylphenidate and d-amphetamine in minimal brain dysfunction: a double-blind comparison. **Am J Psychiatry**, v.132, n.8, p.868-70, Aug 1975.

- ILAR, N. Definition, nomenclature, and conservation of rat strains. [http://dels.nas.edu/ilar\\_n/ilarhome/index.shtml](http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarhome/index.shtml), v.34, n.4. 1992.
- IZIDIO, G. S. et al. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes Brain Behav**, v. 4, n. 7, p. 412-9, Oct 2005.
- JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 3, p. 247-64, Mar 2006.
- JACOBSON, K. A. et al. Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment. **Trends Pharmacol Sci**, v.17, n.3, p.108-13, Mar 1996.
- JARVIS, M. F.; JACKSON, R. H.; WILLIAMS, M. Autoradiographic characterization of high-affinity adenosine A2 receptors in the rat brain. **Brain Res**, v. 484, n. 1-2, p. 111-8, Apr 10 1989.
- JENTSCH, J. D.; TAYLOR, J. R. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. **Psychopharmacology (Berl)**, v.146, n.4, p.373-90, Oct 1999.
- JESSOR, R. Risk behavior in adolescence: a psychosocial framework for understanding and action. **J Adolesc Health**, v. 12, n. 8, p. 597-605, Dec 1991.
- JUCAITE, A. et al. Reduced midbrain dopamine transporter binding in male adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: association between striatal dopamine markers and motor hyperactivity. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 3, p. 229-38, Feb 1 2005.
- KALSBECK, A. et al. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. **J Comp Neurol**, v. 269, n. 1, p. 58-72, Mar 1 1988.
- KAMINER, Y. Pharmacotherapy for adolescents with psychoactive substance use disorders. **NIDA Res Monogr**, v. 156, p. 291-324, 1995.
- KANDEL, D. B.; LOGAN, J. A. Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: I. Periods of risk for initiation, continued use, and discontinuation. **Am J Public Health**, v. 74, n. 7, p. 660-6, Jul 1984.
- KANTAK, K. M. et al. Advancing the spontaneous hypertensive rat model of attention deficit/hyperactivity disorder. **Behav Neurosci**, v. 122, n. 2, p. 340-57, Apr 2008.

KARCZ-KUBICHA, M. et al. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. **Neuropsychopharmacology**, v.28, n.7, p.1281-91, Jul 2003.

KESSLER, R. C. et al. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. **Am J Psychiatry**, v. 163, n. 4, p. 716-23, Apr 2006.

\_\_\_\_\_. Patterns and predictors of attention-deficit/hyperactivity disorder persistence into adulthood: results from the national comorbidity survey replication. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1442-51, Jun 1 2005.

KHANNA, J. M. et al. Initial sensitivity, acute tolerance and alcohol consumption in four inbred strains of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 101, n. 3, p. 390-5, 1990.

KIELING, C. et al. The age at onset of attention deficit hyperactivity disorder. **Am J Psychiatry**, v. 167, n. 1, p. 14-6, Jan 2010.

KHOSHBOUEI, H. et al. N-terminal phosphorylation of the dopamine transporter is required for amphetamine-induced efflux. **PLoS Biol**, v.2, n.3, p.E78, Mar 2004.

KLEBAUR, J. E. et al. Individual differences in behavioral responses to novelty and amphetamine self-administration in male and female rats. **Behav Pharmacol**, v. 12, n. 4, p. 267-75, Jul 2001.

KLOTZ, K. N. et al. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v.357, n.1, p.1-9, Jan 1998.

KOFALVI, A. et al. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. **J Neurosci**, v.25, n.11, p.2874-84, Mar 2005.

KOOB, G. F.; NESTLER, E.J. The neurobiology of drug addiction. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v.9, n.3, p.482-97. 1997.

KOPPELSTAETTER, F. et al. Does caffeine modulate verbal working memory processes? An fMRI study. **Neuroimage**, v.39, n.1, p.492-9, Jan 2008.

KRAUSE, K. H. et al. The dopamine transporter and neuroimaging in attention deficit hyperactivity disorder. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 7, p. 605-13, Nov 2003.

KUHAR, M. J. et al. Localization of dopamine transporter protein by microscopic histochemistry. **Adv Pharmacol**, v.42, p.168-70, 1998.

KUROKAWA, M. et al. Inhibition by KF17837 of adenosine A2A receptor-mediated modulation of striatal GABA and ACh release. **Br J Pharmacol**, v.113, n. 1, p. 43-8, Sep 1994.

LAKE, K. D. et al. Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1-like cannabinoid receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v.281, n.3, p.1030-7, Jun 1997.

LAMBERT, N. M.; HARTSOUGH, C. S. Prospective study of tobacco smoking and substance dependencies among samples of ADHD and non-ADHD participants. **J Learn Disabil**, v.31, n.6, p.533-44, Nov-Dec 1998.

LATINI, S. et al. A2 adenosine receptors: their presence and neuromodulatory role in the central nervous system. **Gen Pharmacol**, v. 27, n. 6, p. 925-33, Sep 1996.

LEHOHLA, M. et al. NMDA receptor function in the prefrontal cortex of a rat model for attention-deficit hyperactivity disorder. **Metab Brain Dis**, v.19, n.1-2, p.35-42, Jun 2004.

LEHOHLA, M. et al. Effect of enriched environment on Ca<sup>2+</sup> uptake via NMDA receptors into barrel cortex slices of spontaneously hypertensive rats. **Metab Brain Dis**, v.19, n.1-2, p.25-33, Jun 2004.

LEITE, J. R.; CARLINI, E.A. Failure to obtain "cannabis-directed behavior" and abstinence syndrome in rats chronically treated with cannabis sativa extracts. **Psychopharmacologia**, v.36, n.2, p.133-45, Apr 1974.

LEO, D. et al. Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD. **Neurosci Biobehav Rev**, v.27, n.7, p.661-9, Nov 2003.

LEON-CARRION, J.; GARCIA-ORZA, J.; PEREZ-SANTAMARIA, F. J. Development of the inhibitory component of the executive functions in children and adolescents. **Int J Neurosci**, v. 114, n. 10, p. 1291-311, Oct 2004.

LESHNER, A. I.; KOOB, G. F. Drugs of abuse and the brain. **Proc Assoc Am Physicians**, v. 111, n. 2, p. 99-108, Mar-Apr 1999.

LEVESQUE, D. et al. Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 17, p. 8155-9, Sep 1 1992.

LEVIN, F. R.; KLEBER, H. D. Attention-deficit hyperactivity disorder and substance abuse: relationships and implications for treatment. **Harv Rev Psychiatry**, v. 2, n. 5, p. 246-58, Jan-Feb 1995. ISSN 1067-3229 (Print) 1067-3229 (Linking).

LEVY, F.; FARROW, M. Working memory in ADHD: prefrontal/parietal connections. **Curr Drug Targets**, v. 2, n. 4, p. 347-52, Dec 2001.

LI, Q. et al. The usefulness of the spontaneously hypertensive rat to model attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) may be explained by the differential expression of dopamine-related genes in the brain. **Neurochem Int**, v. 50, n. 6, p. 848-57, May 2007.

LI, Q. et al. Gene expression of synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) in the prefrontal cortex of the spontaneously hypertensive rat (SHR). **Biochim Biophys Acta**, v.1792, n.8, p.766-76, Aug 2009.

LIEBERMAN, H. R. et al. Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training. Sea-Air-Land. **Psychopharmacology (Berl)**, v.164, n.3, p.250-61, Nov 2002.

LOKE, W. H. Effects of caffeine on mood and memory. **Physiol Behav**, v.44, n.3, p.367-72. 1988.

LONCAREVIC-VASILJKOVIC, N. et al. Changes in markers of neuronal and glial plasticity after cortical injury induced by food restriction. **Exp Neurol**, v.220, n.1, p.198-206, Nov 2009.

LOPES, L. V. et al. Adenosine A3 receptors are located in neurons of the rat hippocampus. **Neuroreport**, v. 14, n. 12, p. 1645-8, Aug 26 2003.

LUCIANA, M. et al. The development of nonverbal working memory and executive control processes in adolescents. **Child Dev**, v. 76, n. 3, p. 697-712, May-Jun 2005

LUNA, B. et al. Maturation of cognitive processes from late childhood to adulthood. **Child Dev**, v. 75, n. 5, p. 1357-72, Sep-Oct 2004.

MACKAY, T. F.; ANHOLT, R. R. Ain't misbehavin' ? Genotype-environment interactions and the genetics of behavior. **Trends Genet**, v. 23, n. 7, p. 311-4, Jul 2007.

MANSBACH, R. S. et al. Failure of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and CP 55,940 to maintain intravenous self-administration under a fixed-interval schedule in rhesus monkeys. **Behav Pharmacol**, v.5, n.2, p.219-225, Apr 1994.

MARSICANO, G. et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature**, v.418, n.6897, p.530-4, Aug 2002.

MATTSON, M. P. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. **Brain Res**, v.886, n.1-2, p.47-53, Dec 2000.

MAYFIELD, R. D. et al. Modulation of endogenous GABA release by an antagonistic adenosine A1/dopamineD1 receptor interaction in rat brain limbic regions but not basal ganglia. **Synapse**, v. 33, n. 4, p. 274-81, Sep 15 1999.

MAYFIELD, R. D.; ZAHNISER, N. R. Dopamine D2 receptor regulation of the dopamine transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes is voltage-independent. **Mol Pharmacol**, v.59, n.1, p.113-21, Jan 2001.

MCBRIDE, W. J.; MURPHY, J. M.; IKEMOTO, S. Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. **Behav Brain Res**, v. 101, n. 2, p. 129-52, Jun 1999.

MCCLEARN, G. E. Contextual genetics. **Trends Genet**, v. 22, n. 6, p. 314-9, Jun 2006.

MCDONALD, R. J.; WHITE, N. M. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. **Behav Neurosci**, v. 107, n. 1, p. 3-22, Feb 1993.

MCGOUGH, J. J. et al. Psychiatric comorbidity in adult attention deficit hyperactivity disorder: findings from multiplex families. **Am J Psychiatry**, v. 162, n. 9, p. 1621-7, Sep 2005.

MCGREGOR, I. S.; ISSAKIDIS, C. N.; PRIOR, G. Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55,940 in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 53, n. 3, p. 657-64, Mar 1996.

MEIERGERD, S. M. et al. D2 receptors may modulate the function of the striatal transporter for dopamine: kinetic evidence from studies in vitro and in vivo. **J Neurochem**, v.61, n.2, p.764-7, Aug 1993.

MIHARA, T. et al. Pharmacological characterization of a novel, potent adenosine A1 and A2A receptor dual antagonist, 5-[5-amino-3-(4-fluorophenyl)pyrazin-2-yl]-1-isopropylpyridine-2(1H)-one (ASP5854), in

models of Parkinson's disease and cognition. **J Pharmacol Exp Ther**, v.323, n.2, p.708-19, Nov 2007.

MOREAU, J. L.; HUBER, G. Central adenosine A(2A) receptors: an overview. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 31, n. 1, p. 65-82, Dec 1999.

MULY, E. C., 3RD; SZIGETI, K.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. D1 receptor in interneurons of macaque prefrontal cortex: distribution and subcellular localization. **J Neurosci**, v. 18, n. 24, p. 10553-65, Dec 15 1998.

MORTENSEN, O. V.; AMARA, S. G. Dynamic regulation of the dopamine transporter. **Eur J Pharmacol**, v.479, n.1-3, p.159-70, Oct 2003.

MORTENSEN, O. V. et al. Genetic complementation screen identifies a mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP3, as a regulator of dopamine transporter trafficking. **Mol Biol Cell**, v.19, n.7, p.2818-29, Jul 2008.

NADAL, R.; ARMARIO, A.; JANAK, P. H. Positive relationship between activity in a novel environment and operant ethanol self-administration in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 162, n. 3, p. 333-8, Jul 2002.

NAPIER, T. C.; MITROVIC, I. Opioid modulation of ventral pallidal inputs. **Ann N Y Acad Sci**, v. 877, p. 176-201, Jun 29 1999.

NORENBERG, W. et al. Adenosine A2A receptors inhibit the conductance of NMDA receptor channels in rat neostriatal neurons. **Amino Acids**, v.14, n.1-3, p.33-9. 1998.

\_\_\_\_\_. Effect of adenosine and some of its structural analogues on the conductance of NMDA receptor channels in a subset of rat neostriatal neurones. **Br J Pharmacol**, v.122, n.1, p.71-80, Sep 1997.

ONAIVI, E. S. Cannabinoid receptors in brain: pharmacogenetics, neuropharmacology, neurotoxicology, and potential therapeutic applications. **Int Rev Neurobiol**, v.88, p.335-69. 2009.

ONGINI, E.; FREDHOLM, B. B. Pharmacology of adenosine A2A receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v. 17, n. 10, p. 364-72, Oct 1996.

OVERMAN, W. H. et al. Performance on the IOWA card task by adolescents and adults. **Neuropsychologia**, v. 42, n. 13, p. 1838-51, 2004.

PAGONOPOULOU, O.; ANGELATOU, F. Reduction of A1 adenosine receptors in cortex, hippocampus and cerebellum in ageing mouse brain. **Neuroreport**, v. 3, n. 9, p. 735-7, Sep 1992.



PAMPLONA, F. A. et al. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.188, n.4, p.641-9, Nov 2006.

PAMPLONA, F. A.; TAKAHASHI, R. N. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. **Neurosci Lett**, v.397, n.1-2, p.88-92, Apr 2006.

PANDOLFO, P. et al. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. **Eur J Pharmacol**, v. 563, n. 1-3, p. 141-8, Jun 1 2007.

PATTIJ, T. et al. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant on distinct measures of impulsive behavior in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.193, n.1, p.85-96, Jul 2007.

PATTIJ, T. et al. Cannabinoid modulation of executive functions. **Eur J Pharmacol**, v.585, n.2-3, p.458-63, May 2008.

PAUS, T.; KESHAVAN, M.; GIEDD, J. N. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 12, p. 947-57, Dec 2008.

PAYTON, A. et al. Examining for association between candidate gene polymorphisms in the dopamine pathway and attention-deficit hyperactivity disorder: a family-based study. **Am J Med Genet**, v.105, n.5, p.464-70, Jul 2001.

PIRES, V. A. et al. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behav Pharmacol**, v.20, n.2, p.134-45, Mar 2009.

\_\_\_\_\_. Chronic caffeine treatment during prepubertal period confers long-term cognitive benefits in adult spontaneously hyperactivity rats (SHR), an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Behav Brain Res**, v.215, n.1, p.39-44, Dec 2010.

POETA, L. S.; ROSA NETO, F. [Epidemiological study on symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder and behavior disorders in public schools of Florianopolis/SC using the EDAH]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26, n. 3, p. 150-5, Sep 2004.

POLANCZYK, G. et al. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. **Am J Psychiatry**, v. 164, n. 6, p. 942-8, Jun 2007.

POPOLI, P. et al. Adenosine A1 and A2A receptor antagonists stimulate motor activity: evidence for an increased effectiveness in aged rats. **Neurosci Lett**, v.251, n.3, p.201-4, Jul 1998.

POWELL, K. R. et al. The role of dopamine in the locomotor stimulant effects and tolerance to these effects of caffeine. **Pharmacol Biochem Behav**, v.69, n.1-2, p.59-70, May-Jun 2001.

PREDIGER, R. D. et al. Adenosine A1 receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. **Eur J Pharmacol**, v.499, n.1-2, p.147-54, Sep 2004.

\_\_\_\_\_. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol Aging**, v.26, n.6, p.957-64, Jun 2005.

\_\_\_\_\_. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behav Pharmacol**, v.16, n.4, p.209-18, Jul 2005.

\_\_\_\_\_. Activation of adenosine A1 receptors reduces anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal (hangover) in mice. **Neuropsychopharmacology**, v.31, n.10, p.2210-20, Oct 2006.

\_\_\_\_\_. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behav Brain Res**, v.159, n.2, p.197-205, Apr 2005.

\_\_\_\_\_. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behav Brain Res**, v.177, n.2, p.205-13, Feb 27 2007.

\_\_\_\_\_. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) -- the spontaneously hypertensive rat (SHR). **Int J Neuropsychopharmacol**, v.8, n.4, p.583-94, Dec 2005.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v.463, n.1-3, p.3-33, Feb 2003.

QUIROZ, C. et al. Key modulatory role of presynaptic adenosine A2A receptors in cortical neurotransmission to the striatal direct pathway. **ScientificWorldJournal**, v. 9, p. 1321-44, 2009.

RAMAEKERS, J. G. et al. High-potency marijuana impairs executive function and inhibitory motor control. **Neuropsychopharmacology**, v.31, n.10, p.2296-303, Oct 2006.

RAMKUMAR, V. et al. Multiple components of the A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system are regulated in rat cerebral cortex by chronic caffeine ingestion. **J Clin Invest**, v.82, n.1, p.242-7, Jul 1988.

RAMOS, A. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behav Brain Res**, v. 85, n. 1, p. 57-69, Apr 1997.

REBOLA, N. et al. Enhanced adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. **J Neurophysiol**, v. 90, n. 2, p. 1295-303, Aug 2003.

RAO, S. G. et al. Destruction and creation of spatial tuning by disinhibition: GABA(A) blockade of prefrontal cortical neurons engaged by working memory. **J Neurosci**, v.20, n.1, p.485-94, Jan 2000.

RHODES, S. E.; KILLCROSS, S. Lesions of rat infralimbic cortex enhance recovery and reinstatement of an appetitive Pavlovian response. **Learn Mem**, v. 11, n. 5, p. 611-6, Sep-Oct 2004.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIAO, A. M.; DE MENDONCA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Prog Neurobiol**, v. 68, n. 6, p. 377-92, Dec 2002.

RIEDEL, G.; DAVIES, S. N. Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. **Handb Exp Pharmacol**, n.168, p.445-77. 2005.

RIKSEN, N. P. et al. Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: implications for coronary heart disease. **Pharmacol Ther**, v.121, n.2, p.185-91, Feb 2009.

RITCHIE, K. et al. The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). **Neurology**, v.69, n.6, p.536-45, Aug 2007.

ROBBINS, T. W. ADHD and addiction. **Nat Med**, v. 8, n. 1, p. 24-5, Jan 2002.

ROBINSON, L. et al. The synthetic cannabinoid HU210 induces spatial memory deficits and suppresses hippocampal firing rate in rats. **Br J Pharmacol**, v.151, n.5, p.688-700, Jul 2007.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. **Addiction**, v.95 Suppl 2, p.S91-117, Aug 2000.

ROESSNER, V. et al. Methylphenidate normalizes elevated dopamine transporter densities in an animal model of the attention-deficit/hyperactivity disorder combined type, but not to the same extent in one of the attention-deficit/hyperactivity disorder inattentive type. **Neuroscience**, v.167, n.4, , p.1183-91 Jun 2010.

ROMAN, T. et al. Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. **Am J Med Genet**, v.105, n.5, , p.471-8, Jul 2001.

ROMANIDES, A. J. et al. Glutamatergic and dopaminergic afferents to the prefrontal cortex regulate spatial working memory in rats. **Neuroscience**, v.92, n.1, p.97-106. 1999.

ROMANOS, M. et al. Structural abnormality of the substantia nigra in children with attention-deficit hyperactivity disorder. **J Psychiatry Neurosci**, v. 35, n. 1, p. 55-8, Jan 2010.

RUSSELL, V.; ALLIE, S.; WIGGINS, T. Increased noradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. **Behav Brain Res**, v. 117, n. 1-2, p. 69-74, Dec 20 2000.

RUSSELL, V. et al. Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. **Brain Res**, v. 676, n. 2, p. 343-51, Apr 10 1995.

\_\_\_\_\_. 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. **Behav Brain Res**, v. 94, n. 1, p. 163-71, Jul 1998.

RUSSELL, V. A. Increased AMPA receptor function in slices containing the prefrontal cortex of spontaneously hypertensive rats. **Metab Brain Dis**, v.16, n.3-4, p.143-9, Dec 2001.

\_\_\_\_\_. Reprint of "Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder". **J Neurosci Methods**, v. 166, n. 2, p. I-XIV, Nov 30 2007.

RUSSELL, V. A.; WIGGINS, T. M. Increased glutamate-stimulated norepinephrine release from prefrontal cortex slices of spontaneously hypertensive rats. **Metab Brain Dis**, v.15, n.4, p.297-304, Dec 2000.

RYZHOV, S. et al. Cross-talk between G(s)- and G(q)-coupled pathways in regulation of interleukin-4 by A(2B) adenosine receptors in human mast cells. **Mol Pharmacol**, v. 70, n. 2, p. 727-35, Aug 2006.

SAGVOLDEN, T. et al. A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. **Behav Brain Sci**, v. 28, n. 3, p. 397-419; discussion 419-68, Jun 2005.

\_\_\_\_\_. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 7-8, p. 619-26, Dec 2009.

\_\_\_\_\_. The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of childhood hyperactivity (ADHD): changed reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants. **Behav Neural Biol**, v. 58, n. 2, p. 103-12, Sep 1992.

\_\_\_\_\_. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1239-47, Jun 1 2005.

SATEL, S. Is caffeine addictive?--a review of the literature. **Am J Drug Alcohol Abuse**, v.32, n.4, p.493-502. 2006.

SCAHILL, L. et al. Psychosocial and clinical correlates of ADHD in a community sample of school-age children. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 38, n. 8, p. 976-84, Aug 1999.

SCHECHTER, M. D.; TIMMONS, G. D. Objectively measured hyperactivity--II. Caffeine and amphetamine effects. **J Clin Pharmacol**, v.25, n.4, p.276-80, May-Jun 1985.

SCHERES, A. et al. Executive functioning in boys with ADHD: primarily an inhibition deficit? **Arch Clin Neuropsychol**, v.19, n.4, p.569-94, Jun 2004.

SCHIFFMANN, S. N.; JACOBS, O.; VANDERHAEGHEN, J. J. Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by

substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. **J Neurochem**, v. 57, n. 3, p. 1062-7, Sep 1991.

SCHUBINER, H.; KATRAGADDA, S. Overview of epidemiology, clinical features, genetics, neurobiology, and prognosis of adolescent attention-deficit/hyperactivity disorder. **Adolesc Med State Art Rev**, v. 19, n. 2, p. 209-15, vii, Aug 2008.

SCHULTE, G.; FREDHOLM, B. B. The G(s)-coupled adenosine A(2B) receptor recruits divergent pathways to regulate ERK1/2 and p38. **Exp Cell Res**, v. 290, n. 1, p. 168-76, Oct 15 2003a.

\_\_\_\_\_. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. **Cell Signal**, v. 15, n. 9, p. 813-27, Sep 2003b.

SEBASTIAO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 9, p. 341-6, Sep 2000.

\_\_\_\_\_. Adenosine receptors and the central nervous system. **Handb Exp Pharmacol**, n. 193, p. 471-534, 2009.

SEEMAN, P. et al. Human brain dopamine receptors in children and aging adults. **Synapse**, v. 1, n. 5, p. 399-404, 1987.

SEEMAN, P.; MADRAS, B. K. Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. **Mol Psychiatry**, v. 3, n. 5, p. 386-96, Sep 1998.

SESACK, S. R.; SNYDER, C. L.; LEWIS, D. A. Axon terminals immunolabeled for dopamine or tyrosine hydroxylase synapse on GABA-immunoreactive dendrites in rat and monkey cortex. **J Comp Neurol**, v. 363, n. 2, p. 264-80, Dec 11 1995.

SHEN, H. Y. et al. A critical role of the adenosine A2A receptor in extrastriatal neurons in modulating psychomotor activity as revealed by opposite phenotypes of striatum and forebrain A2A receptor knock-outs. **J Neurosci**, v.28, n.12, p.2970-519, Mar 2008.

SHI, D. et al. Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. **Cell Mol Neurobiol**, v.13, n.3, p.247-61, Jun 1993.

SICARD, B. A. et al. The effects of 600 mg of slow release caffeine on mood and alertness. **Aviat Space Environ Med**, v.67, n.9, p.859-62, Sep 1996.

SIMON, V. et al. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. **Br J Psychiatry**, v. 194, n. 3, p. 204-11, Mar 2009.

SOLLNER, T. et al. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. **Cell**, v.75, n.3, p.409-18, Nov 1993.

SOLLNER, T. et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. **Nature**, v.362, n.6418, p.318-24, Mar 1993.

SORIA, G. et al. Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. **Eur J Neurosci**, v.20, n.8, p.2203-13, Oct 2004.

SOWELL, E. R. et al. Localizing age-related changes in brain structure between childhood and adolescence using statistical parametric mapping. **Neuroimage**, v. 9, n. 6 Pt 1, p. 587-97, Jun 1999.

\_\_\_\_\_. Mapping continued brain growth and gray matter density reduction in dorsal frontal cortex: Inverse relationships during postadolescent brain maturation. **J Neurosci**, v. 21, n. 22, p. 8819-29, Nov 15 2001

\_\_\_\_\_. Cortical abnormalities in children and adolescents with attention-deficit hyperactivity disorder. **Lancet**, v. 362, n. 9397, p. 1699-707, Nov 22 2003.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci Biobehav Rev**, v.24, n.4, p.417-63, Jun 2000.

SPENCER, T. et al. Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder across the life cycle. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 35, n. 4, p. 409-32, Apr 1996.

SPERLAGH, B. et al. Neurochemical evidence that stimulation of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic nerve terminals activates the dopaminergic reward system by increasing dopamine release in the rat nucleus accumbens. **Neurochem Int**, v. 54, n. 7, p. 452-7, Jun 2009.

STAPLETON, J. A., G. Sutherland, et al. Association between dopamine transporter genotypes and smoking cessation: a meta-analysis. **Addict Biol**, v.12, n.2, p.221-6, Jun 2007.

STEINBERG, L. A Social Neuroscience Perspective on Adolescent Risk-Taking. **Dev Rev**, v. 28, n. 1, p. 78-106, Mar 2008.

STOFF, D. M. et al. Elevated platelet MAO is related to impulsivity in disruptive behavior disorders. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 28, n. 5, p. 754-60, Sep 1989.

SVENNINGSSON, P. et al. Antagonism of adenosine A2A receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. **Neuroscience**, v.79, n.3, p.753-64, Aug 1997.

SWANSON, J. M. Dopamine genes and ADHD. **Neurosci Biobehav Rev**, v.24, n.1, Jan, p.21-5. 2000.

TAKAHASHI, R. N. et al. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. **Neurosci Lett**, v.380, n.3, p.270-5, Jun 3 2005.

TAKAHASHI, R. N.; PAMPLONA, F. A.; PREDIGER, R. D. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. **Front Biosci**, v. 13, p. 2614-32, 2008.

TAKAHASHI, R. N.; SINGER, G. Self-administration of delta 9-tetrahydrocannabinol by rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 11, n. 6, p. 737-40, Dec 1979.

TARAZI, F. I.; BALDESSARINI, R. J. Comparative postnatal development of dopamine D(1), D(2) and D(4) receptors in rat forebrain. **Int J Dev Neurosci**, v. 18, n. 1, p. 29-37, Feb 2000.

TARAZI, F. I.; ZHANG, K.; BALDESSARINI, R. J. Dopamine D4 receptors: beyond schizophrenia. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 24, n. 3, p. 131-47, Aug 2004.

TAYLOR, E. et al. European clinical guidelines for hyperkinetic disorder -- first upgrade. **Eur Child Adolesc Psychiatry**, v. 13 Suppl 1, p. 17-30, 2004.

TEICHER, M. H.; ANDERSEN, S. L.; HOSTETTER, J. C., JR. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 89, n. 2, p. 167-72, Nov 21 1995.

TRIPP, G.; WICKENS, J. R. Neurobiology of ADHD. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 7-8, p. 579-89, Dec 2009.

THIEBOT, M. H. et al. Benzodiazepines reduce the tolerance to reward delay in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.86, n.1-2, p.147-52. 1985.



- TRIPP, G.; Wickens, J. R. Neurobiology of ADHD. **Neuropharmacology**, v.57, n.7-8, p.579-89, Dec 2009.
- TSAI, C. F.; LIN, M. T. Locomotor hyperactivity in hypertensive rats. **Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 27-34, 1988.
- TWITCHELL, W.; BROWN, S.; MACKIE, K. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. **J Neurophysiol**, v. 78, n. 1, p. 43-50, Jul 1997.
- TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. **Addict Biol**, v.12, n.3-4, p.227-462, Sep 2007.
- UHDE, T. W. et al. Caffeine: relationship to human anxiety, plasma MHPG and cortisol. **Psychopharmacol Bull**, v.20, n.3, p.426-30, Summer 1984.
- USUDA, I.; TANAKA, K.; CHIBA, T. Efferent projections of the nucleus accumbens in the rat with special reference to subdivision of the nucleus: biotinylated dextran amine study. **Brain Res**, v. 797, n. 1, p. 73-93, Jun 22 1998.
- VALJENT, E.; MALDONADO, R. A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 147, n. 4, p. 436-8, Jan 2000.
- VALTORTA, F. et al. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? **Bioessays**, v.26, n.4, p.445-53, Apr 2004.
- VAN GAALEN, M. M. et al. Critical involvement of dopaminergic neurotransmission in impulsive decision making. **Biol Psychiatry**, v.60, n.1, p.66-73, Jul 2006.
- VENDRUSCOLO, L. F.; IZIDIO, G. S.; TAKAHASHI, R. N. Drug reinforcement in a rat model of attention deficit/hyperactivity disorder--the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). **Curr Drug Abuse Rev**, v. 2, n. 2, p. 177-83, May 2009.
- VENDRUSCOLO, L. F. et al. Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. **Genes Brain Behav**, v. 5, n. 6, p. 441-50, Aug 2006.

\_\_\_\_\_. Marker-assisted dissection of genetic influences on motor and neuroendocrine sensitization to cocaine in rats. **Genes Brain Behav**, v. 8, n. 3, p. 267-74, Apr 2009.

VERNEY, C. et al. Development of the dopaminergic innervation of the rat cerebral cortex. A light microscopic immunocytochemical study using anti-tyrosine hydroxylase antibodies. **Brain Res**, v. 281, n. 1, p. 41-52, Sep 1982.

\_\_\_\_\_. Postnatal sequential development of dopaminergic and enkephalinergic perineuronal formations in the lateral septal nucleus of the rat correlated with local neuronal maturation. **Anat Embryol (Berl)**, v. 176, n. 4, p. 463-75, 1987.

VERRICO, C. D. et al. Repeated, intermittent delta(9)-tetrahydrocannabinol administration to rats impairs acquisition and performance of a test of visuospatial divided attention. **Neuropsychopharmacology**, v.29, n.3, p.522-9, Mar 2004.

VITIELLO, B. Understanding the risk of using medications for attention deficit hyperactivity disorder with respect to physical growth and cardiovascular function. **Child Adolesc Psychiatr Clin N Am**, v.17, n.2, p.459-74, Apr 2008.

VLACHOU, S. et al. CB1 cannabinoid receptor agonists increase intracranial self-stimulation thresholds in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v.179, n.2, p.498-508, May 2005.

VON SYDOW, K. et al. The natural course of cannabis use, abuse and dependence over four years: a longitudinal community study of adolescents and young adults. **Drug Alcohol Depend**, v. 64, n. 3, p. 347-61, Nov 1 2001.

WAHLSTEN, D. et al. Stability of inbred mouse strain differences in behavior and brain size between laboratories and across decades. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 44, p. 16364-9, Oct 31 2006.

WAHLSTROM, D.; WHITE, T.; LUCIANA, M. Neurobehavioral evidence for changes in dopamine system activity during adolescence. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 34, n. 5, p. 631-48, Apr 2010.

WANG, J. H. et al. Improved spatial recognition memory in mice lacking adenosine A2A receptors. **Exp Neurol**, v.199, n.2, p.438-45, Jun 2006.

WATANABE, Y. et al. Brain dopamine transporter in spontaneously hypertensive rats. **J Nucl Med**, v. 38, n. 3, p. 470-4, Mar 1997.

WEDZONY, K.; CZEPIEL, K.; FIJAL, K. Immunohistochemical evidence for localization of NMDAR1 receptor subunit on dopaminergic neurons of the rat

substantia nigra, pars compacta. **Pol J Pharmacol**, v. 53, n. 6, p. 675-9, Nov-Dec 2001.

WHEAL, A. J. et al. Cardiovascular effects of cannabinoids in conscious spontaneously hypertensive rats. **Br J Pharmacol**, v.152, n.5, p.717-24, Nov 2007.

WIGAL, T. et al. Safety and tolerability of methylphenidate in preschool children with ADHD. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v.45, n.11, p.1294-303, Nov 2006.

WILENS, T. E. Attention-deficit/hyperactivity disorder and the substance use disorders: the nature of the relationship, subtypes at risk, and treatment issues. **Psychiatr Clin North Am**, v. 27, n. 2, p. 283-301, Jun 2004.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 83, n. 1, p. 1-16, 1984.

WILLS, T. A.; SANDY, J. M.; SHINAR, O. Cloninger's constructs related to substance use level and problems in late adolescence: a mediational model based on self-control and coping motives. **Exp Clin Psychopharmacol**, v. 7, n. 2, p. 122-34, May 1999.

WILSON, J. J.; LEVIN, F. R. Attention-deficit/hyperactivity disorder and early-onset substance use disorders. **J Child Adolesc Psychopharmacol**, v. 15, n. 5, p. 751-63, Oct 2005.

WINSTANLEY, C. A. et al. Double dissociation between serotonergic and dopaminergic modulation of medial prefrontal and orbitofrontal cortex during a test of impulsive choice. **Cereb Cortex**, v.16, n.1, p.106-14, Jan 2006.

WIRKNER, K. et al. Adenosine A2A receptor-induced inhibition of NMDA and GABAA receptor-mediated synaptic currents in a subpopulation of rat striatal neurons. **Neuropharmacology**, v.46, n.7, p.994-1007, Jun 2004.

WORDEN, L. T. et al. The adenosine A2A antagonist MSX-3 reverses the effort-related effects of dopamine blockade: differential interaction with D1 and D2 family antagonists. **Psychopharmacology (Berl)**, v.203, n.3, p.489-99, Apr 2009.

WULTZ, B. et al. The spontaneously hypertensive rat as an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate on exploratory behavior. **Behav Neural Biol**, v. 53, n. 1, p. 88-102, Jan 1990.

YAMAGUCHI, K.; KANDEL, D. B. Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: III. Predictors of progression. **Am J Public Health**, v. 74, n. 7, p. 673-81, Jul 1984.

YAO, L. et al. Addicting drugs utilize a synergistic molecular mechanism in common requiring adenosine and Gi-beta gamma dimers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.24, p.14379-84, Nov 2003.

YAO, L. et al. Adenosine A2a blockade prevents synergy between mu-opiate and cannabinoid CB1 receptors and eliminates heroin-seeking behavior in addicted rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.20, p.7877-82, May 2006.

ZAHM, D. S. An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, n. 1, p. 85-105, Jan 2000.

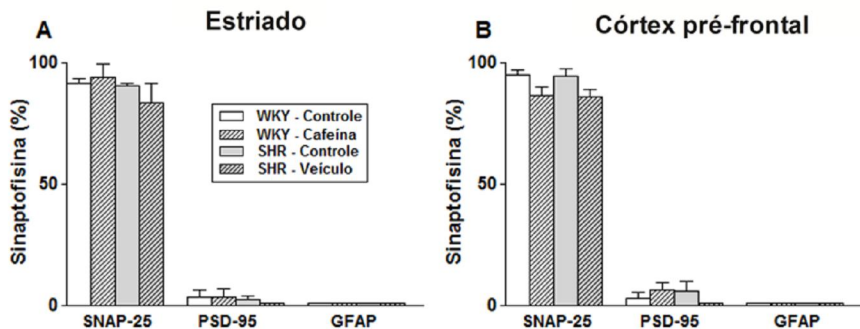
ZAHRT, J. et al. Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. **J Neurosci**, v.17, n.21, p.8528-35, Nov 1997.

ZAPATA, A. et al. Regulation of dopamine transporter function and cell surface expression by D3 dopamine receptors. **J Biol Chem**, v.282, n.49, p.35842-54, Dec 2007.

ZHANG, H. et al. An association study between SNAP-25 gene and Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. **Eur J Paediatr Neurol**, no prelo, Jul 2010.

## Apêndice I

A Figura I mostra que os sinaptossomas utilizados neste estudo eram predominantemente pré-sinápticos, como confirmado pela alta imunoreatividade de um marcador de terminais pré-sináptico (SNAP-25) e pela baixa imunoreatividade de marcadores pós-sináptico (PSD-95) e de células gliais (GFAP) em lamínulas contendo sinaptofisina.



**Figura I.** Quantificação imunocitoquímica da densidade de SNAP-25, PSD-95 e GFAP em sinaptossomas do EST (A) e CPF (B) de ratos WKY e SHR tratados cronicamente com salina ou cafeína (2 mg/kg, i.p., durante 21 dias, duas vezes ao dia). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 2-3 animais por grupo e foram separadas de acordo com o tratamento e linhagem. SNAP-25: Proteína de 25 kDa associada a sinaptossoma; PSD-95: Proteína pós-sináptica de densidade 95 kDa; GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

**Tabela I.** Imunoreatividade dos anticorpos secundários utilizados na técnica de imunocitoquímica em terminais nervosos purificados.

	<b>Alexa 488 (verde)</b>	<b>Alexa 594 (vermelho)</b>	<b>Co-localização (Amarelo)</b>
<b>WKY controle</b>	0	0	<0,01%
<b>WKY cafeína</b>	0	0	<0,01%
<b>SHR controle</b>	0	0	<0,01%
<b>SHR cafeína</b>	0	0	<0,01%



## Apêndice II

**Tabela II.** Os dados (média  $\pm$  E.P.M.) foram obtidos em sinaptossomas não purificados de ratos WKY e SHR, tratados com salina ou cafeína durante a adolescência, e representam a diferença entre a quantidade total de DA captada pelos sinaptossomas e o componente inespecífico da captação de [3H]DA, determinado pela presença do inibidor dos transportadores de dopamina (GBR12783, 1 $\mu$ M).

<b>Estrutura</b>	<b>Grupo</b>	<b>CPM-A*</b>	<b>CPM-B*</b>	<b>DPM*</b>
<b>EST</b>	WKY controle	10465 $\pm$ 837	9869 $\pm$ 789	18332 $\pm$ 1467
	WKY cafeína	12035 $\pm$ 1204	11349 $\pm$ 1135	21082 $\pm$ 2108
	SHR controle	19570 $\pm$ 2348#	18456 $\pm$ 2215	34281 $\pm$ 4114#
	SHR cafeína	14965 $\pm$ 2095	14112 $\pm$ 1976	26215 $\pm$ 3675
<b>CPF</b>	WKY controle	616 $\pm$ 99§	581 $\pm$ 93§	1078 $\pm$ 173§ #
	WKY cafeína	549 $\pm$ 55§	517 $\pm$ 52§	959 $\pm$ 96§
	SHR controle	1201 $\pm$ 144§#	1132 $\pm$ 135§#	2102 $\pm$ 252§#
	SHR cafeína	881 $\pm$ 123§	830 $\pm$ 116§	1542 $\pm$ 216§

EST: estriado; CPF: córtex pré-frontal; CPM: contagem por minuto; DPM: desintegrações por minuto. #p<0,05 em comparação ao grupo WKY controle da mesma estrutura. §p<0,05 em comparação com o respectivo grupo do EST. N=3-4 por grupo.





### **Apêndice III**

**Parte dos resultados desta tese está publicada em periódico científico internacional:**



# Cannabinoid-induced conditioned place preference in the spontaneously hypertensive rat—an animal model of attention deficit hyperactivity disorder

Pablo Pandolfo · Leandro F. Vendruscolo · Regina Sordi · Reinaldo N. Takahashi

Received: 1 October 2008 / Accepted: 8 April 2009  
© Springer-Verlag 2009

## Abstract

**Rationale** Cannabis preparations are the most widely consumed illicit drugs, and their use typically begins in adolescence. The prevalence of cannabis abuse is higher in patients with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) than in the general population, yet, knowledge about the motivational properties of cannabinoids in animal models of ADHD are lacking.

**Objective** To compare the motivational effects of the synthetic cannabinoid agonist WIN55,212-2 (WIN) in adolescent and adult spontaneously hypertensive rats (SHR), a validated animal model of ADHD, and Wistar rats, representing a “normal” genetically heterogeneous population. We also asked whether the effects of WIN depended (1) on the activation of the cerebral subtype of cannabinoid receptors, namely, the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor and (2) on putative changes by WIN in blood pressure.

**Methods** WIN was tested under an unbiased conditioned place preference (CPP) paradigm. Blood pressure after WIN administration was also monitored in additional groups of rats.

**Results** In the Wistar rats, WIN produced place aversion only in the adult but not adolescent rats. In contrast, WIN produced CPP in both adolescent and adult SHR rats. The behavioral effects of WIN were CB<sub>1</sub>-mediated and not related to blood pressure.

**Conclusion** The contrasting effects of WIN in Wistar and SHR, and the higher resistance of adolescent rats to the aversive and rewarding effects of WIN in these two strains suggests that both adolescence and the ADHD-like profile exhibited by the SHR strain constitute factors that influence the motivational properties of cannabinoids.

**Keywords** Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) · Drug addiction · Adolescence · Cannabinoid system · Dopamine · Reward · Aversion · Conditioned place preference · Inbred strain · Spontaneously hypertensive rat (SHR)

## Introduction

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is the most commonly diagnosed psychiatric disorder in children, yet its primary symptoms of hyperactivity, inattention and impulsivity (Taylor 1998; Himelstein et al. 2000) can persist into adolescence and adulthood (Biederman et al. 1994). Moreover, comorbidity in ADHD is very common with other psychiatric disorders, such as drug addiction. Notably, marijuana (*Cannabis sativa*) is the most popular illicit drug used by ADHD patients (Crowley et al. 1998; Biederman et al. 2006). It has been hypothesized that hypofunctionality of the mesolimbic dopamine system in ADHD results in an altered reinforcement of behavior and in an inadequate extinction of a previously reinforced behavior (Sagvolden et al. 2005). The presence of these characteristics may contribute to the earlier onset and the

P. Pandolfo · R. Sordi · R. N. Takahashi  
Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC),  
Florianópolis, SC, Brazil

L. F. Vendruscolo  
CNRS-UMR 5227, Université Bordeaux 1 et 2,  
Bordeaux, France

R. N. Takahashi (✉)  
Departamento de Farmacologia,  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
Campus Trindade,  
88049-900 Florianópolis, SC, Brazil  
e-mail: takahashi@farmaco.ufsc.br

higher prevalence of drug abuse observed in ADHD patients compared to the normal population (Crowley et al. 1998; Biederman et al. 2006). Nonetheless, the biological mechanisms underlying the comorbidity between ADHD and drug abuse is largely unknown due in part to the lack of appropriate animal models.

One of the most validated animal models of ADHD is the spontaneously hypertensive rat (SHR). This strain is derived from the Wistar Kyoto (WKY) rat strain (Okamoto and Aoki 1963), and as reviewed by Sagvolden (2000), the SHR presents good face, construct, and predictive validity. Accordingly, SHR rats display hyperactivity, impulsivity, novelty seeking, and sustained attention deficits in comparison with their normotensive controls, the WKY rats (Davids et al. 2003; Russell et al. 2005; Sagvolden et al. 2005). Moreover, the SHR strain has been proposed to be potentially useful for the study of the relationship between ADHD and drug addiction (Vendruscolo et al. 2009) as these rats show increased sensitivity to psychostimulants (Pamplona et al. 2007) and opioids (Hoffmann et al. 1998) and exhibit greater ethanol consumption (Da Silva et al. 2005) than other rat strains. Furthermore, we have reported that an acute dose of the cannabinoid agonist WIN55,212-2 (WIN) promoted locomotor stimulation in adolescent SHR, but not in adult SHR and Wistar rats of any age (Pandolfo et al. 2007). This latter finding suggests that sensitivity to cannabinoids may depend on the age and strain of rats tested.

Despite the well-known abuse liability of cannabinoids in humans, controversial data concerning the discrimination of addictive properties in experimental animals have been reported. For example, cannabinoid agonists induce either aversive (Parker and Gillies 1995; McGregor et al. 1996; Sanudo-Pena et al. 1997) or rewarding (Lepore et al. 1995; Braidia et al. 2004) effects in the conditioned place preference (CPP) paradigm. Similarly, discrepant findings have been reported regarding the hedonic effects of cannabinoids in intracranial self-stimulation (Gardner et al. 1988; Vlachou et al. 2007) and self-administration (Takahashi and Singer 1979; Martellotta et al. 1998; Fattore et al. 2001; Tanda et al. 2000; Deiana et al. 2007; Zangen et al. 2006) procedures.

In view of the limited number of studies concerning ADHD and cannabinoid addiction in humans and the lack of studies directly examining the motivational properties of cannabinoids in animal models of ADHD, the objective of this study was to compare the motivational properties of the cannabinoid receptor agonist WIN in adolescent and adult SHR rats using the CPP paradigm (Tzschentke 2007). It is particularly important to study drug abuse in adolescent subjects because of the tight interactions between the dopaminergic and the endocannabinoid systems in the maturing brain (Maharajan et al. 2001; Crews et al.

2007; Köfalvi and Fritzsche 2008), and because human drug consumption often starts before adulthood (Crowley et al. 1998; Spear 2000). The involvement of CB<sub>1</sub> receptors and the influence of blood pressure on the effects of WIN were also investigated. Furthermore, given the controversial data regarding the effects of cannabinoid in animal models, rats of the widely used Wistar strain, representing a “normal” genetically heterogeneous population, were chosen as controls in all tests, as previously reported (Pandolfo et al. 2007).

## Materials and methods

### Subjects

Adolescent and adult male outbred Wistar and inbred SHR rats ( $n=7-10$  for each age and strain) bred in our own facilities were used. Rats were considered adolescent between post-natal days 28 and 45 (Spear and Brake 1983) and adult between post-natal days 90–110. The average ( $\pm$ S.E.M.) weight of the animals was  $53\pm 2$  and  $310\pm 5$  g for adolescent and adult SHR rats, and  $124\pm 2$  and  $369\pm 8$  g for adolescent and adult Wistar rats, respectively. The animals were housed in groups of four or five per cage and were maintained in a room under controlled temperature ( $22\pm 2^\circ\text{C}$ ) on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 am), with free access to food and water. All procedures used in the present study complied with the guidelines on animal care of the UFSC Ethics Committee on the Use of Animals, which follows the principles of laboratory animal care of the National Institute of Health (NIH).

### Drugs

WIN 55,212-2 [*R*-(+)-(2*S*,3-dihydro-5-methyl-3-[is methyl]pyrrol [1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl)(1-naphthalenyl)methanone mesylate] and the cannabinoid antagonist AM 251 [*N*-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide] were purchased from Tocris. The drugs were dissolved in saline (NaCl, 0.9%) with 10% dimethylsulfoxide plus 0.1% Tween 80, and administered intraperitoneally (i.p.) in a volume of 0.2 ml/100 g of body weight. The control solution consisted of the drug vehicle.

### Conditioned place preference

The motivational properties of WIN were evaluated using an unbiased conditioned place preference (CPP) paradigm (Tzschentke 2007). CPP was tested in four identical rectangular wooden boxes covered with Formica. Each of the CPP boxes consisted of three different compartments

separated by guillotine doors. The two conditioning compartments (30×25×40 cm) had different tactile and visual cues: one compartment was black with a smooth wooden floor and the other was black with vertical white stripes and aluminum floor. The central “neutral” compartment (15×25×40 cm) was gray with a smooth wooden floor and had openings (10×10 cm) that gave access to any of the two other compartments. The test was conducted under low-light conditions (10 lx). The behavior of each animal was recorded via a video camera positioned above the boxes and monitored in an adjacent room via a closed-circuit TV camera. The experimenter was unaware of the drug treatment of the animals during behavioral evaluation. The apparatus was cleaned with a 70% ethanol solution and then dried with a paper towel after each trial.

The CPP protocol consisted of a schedule of 11 days divided into three different phases: pre-conditioning, conditioning, and post-conditioning. In the pre-conditioning phase (the first 2 days), the rats were allowed to freely explore the three compartments for 15 min each day. The time spent by the animal (with all four paws) in each of the three compartments on the second day was recorded.

The conditioning phase consisted of eight 25-min sessions, one per day. Immediately after i.p. administration of WIN (0.125, 0.25, 1.25 or 2.5 mg/kg), the rats were confined in one compartment and, on alternate days, received vehicle and were then confined in the opposite compartment. The control group received vehicle before conditioning in each compartment. For the experiment with the CB<sub>1</sub> antagonist, another group of rats was given AM 251 (0.25 or 1.25 mg/kg, i.p.) or vehicle 20 min before conditioning with WIN or vehicle. Drug doses were selected based on our previous studies (Pamplona et al. 2006; Pandolfo et al. 2007).

In the post-conditioning phase, each animal was placed in the neutral compartment and had free access to all three compartments. The time spent in each compartment was recorded for 15 min.

#### Blood pressure

In an additional group of Wistar and SHR rats, the arterial blood pressure (BP) (mmHg) was measured after i.p. injection of WIN (0.125–2.5 mg/kg) or vehicle, as previously described (Ramos et al. 2002). Under anesthesia with ketamine and xylazine (90 and 15 mg/kg, respectively), a heparinized PE20 polyethylene catheter was inserted into the right carotid artery for recording of systolic and diastolic arterial pressure. To prevent clotting, an i.p. dose of heparin (300 IU) was injected 10 min before the ketamine/xylazine injection. Animals were allowed to breathe spontaneously via a tracheal cannula and body temperature (maintained at 37±1°C) was monitored by a

rectal thermometer. After the surgical procedure, a period of 5 min was allowed for stabilization and immediately after the i.p. administration of saline or WIN, the systolic and diastolic arterial BP were recorded for 30 min. BP data were recorded with a catheter pressure transducer (Mikro-Tip®, Millar Instruments, Inc., Houston, Texas, USA) coupled to a Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). At the end of the experiment, animals were sacrificed with a pentobarbital overdose.

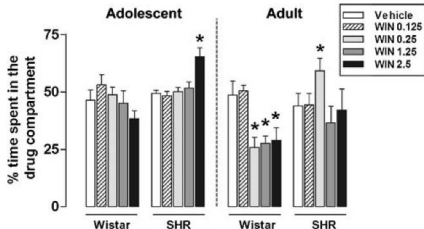
#### Statistical analysis

All results are expressed as means and S.E.M. For the CPP data, the statistical analysis of results for the cannabinoid agonist WIN was carried out using a three-way ANOVA (age, treatment, and strain) on the percentage of time spent in the drug compartment during the post-conditioning test according to the following formula:  $\text{time in the drug-paired compartment} / (\text{time in the drug-paired compartment} + \text{time in the saline-paired compartment}) \times 100$ . The data for the antagonism with AM 251 were analyzed by a one-way ANOVA with treatment as the independent variable. For blood pressure data, analyses were carried out using a three-way ANOVA (age, treatment, and strain). Following significant ANOVAs, multiple post-hoc comparisons were performed using the Duncan's test. The accepted level of significance for all tests was  $P \leq 0.05$ . The analyses were performed using the Statistica® software package (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

## Results

### Conditioned place preference

The results regarding the effects of the cannabinoid agonist WIN (0.125, 0.25, 1.25, or 2.5 mg/kg) in adolescent and adult SHR and Wistar rats tested in the CPP test are shown in Fig. 1. The three-way ANOVA revealed a significant overall effect of strain [ $F(1,153)=14.47, P<0.01$ ], but not of treatment [ $F(4,153)=2.26, P=0.06$ ] and age [ $F(1,153)=3.60, P=0.06$ ] for the percentage of time spent in the drug-paired compartment. A significant interaction between age vs. treatment vs. strain [ $F(4,153)=3.87, P<0.01$ ] was detected. The post-hoc comparisons indicated that vehicle-treated SHR and Wistar rats did not differ in terms of place preference (regardless of age). However, the highest tested dose of WIN (2.5 mg/kg) induced a significant CPP in SHR adolescents, whereas the dose of 0.25 mg/kg produced a significant CPP in SHR adults, compared to their respective control groups ( $P<0.05$ ). Moreover, a significant place aversion at doses of 0.25, 1.25, and 2.5 mg/kg was



**Fig. 1** Effects of treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN (0.125, 0.25, 1.25 or 2.5 mg/kg, i.p.) on place conditioning of adolescent and adult SHR, and Wistar rats. Histograms represent the means and S.E.M. of the percentage of time spent in the drug-paired compartment during the post-conditioning test of animals, grouped by age, strain, and treatment ( $n=8-10$ ). \* $P\leq 0.05$  compared to the respective vehicle-treated control groups

observed in Wistar adults, as indicated by a reduction in the percentage of time spent in the drug-paired compartment compared to vehicle-treated controls ( $P<0.05$ ). No effects were observed for Wistar adolescents.

Figure 2 illustrates the effects of the CB<sub>1</sub>-selective antagonist AM-251 on the rewarding responses of WIN in adolescent and adult SHR rats, and on the aversive responses of WIN in Wistar adults. For SHR rats, the one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment [adolescents:  $F(3,27)=10.4$ ,  $P<0.01$ ; adults:  $F(3,26)=8.64$ ,  $P<0.01$ ] for the percentage of time spent in the drug-paired compartment. As expected, the post-hoc comparisons indicated that WIN induced CPP in SHR adolescents and in SHR adults ( $P<0.05$ ). More importantly, AM 251, which was ineffective when administered alone, prevented the WIN-induced CPP ( $P>0.05$ ). For adult Wistar rats, the ANOVA also revealed a significant effect of treatment [ $F(3,29)=9.34$ ,  $P<0.01$ ] for the percentage of time spent in the drug-paired compartment. The post-hoc comparisons indicated that WIN induced place aversion in adult Wistar rats ( $P<0.05$ ), and that AM 251 prevented this effect ( $P>0.05$ ).

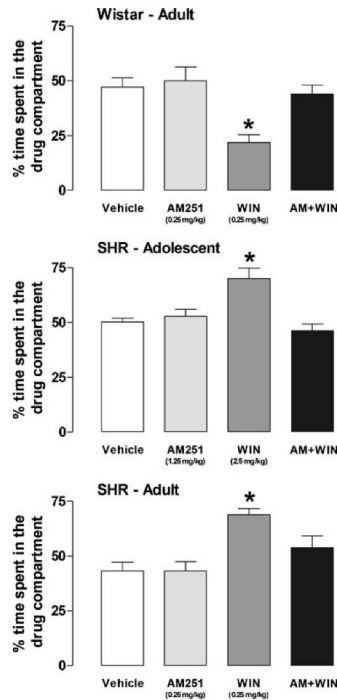
#### Blood pressure

Table 1 shows the results of WIN administration (0.125–2.5 mg/kg i.p.) on the arterial blood pressure (BP) of adolescent and adult SHR and Wistar rats. The three-way ANOVA revealed a significant effect of age [ $F(1,54)=79.95$ ,  $P<0.01$ ], but not of treatment [ $F(4,54)=0.96$ ,  $P=0.43$ ] and strain [ $F(1,54)=0.39$ ,  $P=0.53$ ] for BP. Moreover, a significant interaction between age vs. treatment vs. strain [ $F(4,54)=4.40$ ,  $P<0.01$ ] was detected. The post-hoc comparisons indicated that SHR adults were hypertensive in relation to adolescents ( $P<0.05$ ). Moreover, only the dose of 1.25 mg/kg of WIN induced a significant decrease in the

BP of adult SHR rats. No other significant effects of WIN were found on BP measurements.

#### Discussion

In the present study, we compared the motivational effects of the cannabinoid receptor agonist WIN in adolescent and adult male SHR and Wistar rats using the CPP test. The main finding was the opposing responses exhibited by SHR



**Fig. 2** Effects of pre-treatment with the cannabinoid receptor antagonist AM251 (0.25 or 1.25 mg/kg, i.p.) on place conditioning of adult Wistar rats, and adolescent and adult SHR rats treated with WIN (0.25 or 2.5 mg/kg, i.p.). Effects of treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN (0.25 or 2.5 mg/kg, i.p.) and/or AM 251 (0.25 or 1.25) on place conditioning of adult Wistar rats, and adolescent and adult SHR rats. Histograms represent the means and S.E.M. of the percentage of time spent in drug-paired compartment during the post-conditioning test of animals grouped by age, strain and treatment ( $n=8-10$ ). \* $P\leq 0.05$  compared to the respective vehicle-treated control groups

**Table 1** Effects of the i.p. administration of WIN on mean arterial pressure (mean±S.E.M.) of adolescent and adult SHR and Wistar rats

Age	Strain	Treatment (mg/kg)	Mean arterial pressure (mmHg)
Adolescent	Wistar	Vehicle	85±2.1
		WIN 0.125	80.7±1.5
		WIN 0.25	85.0±3.3
		WIN 1.25	86.3±3.7
		WIN 2.5	84±1
	SHR	Vehicle	78.3±0.8
		WIN 0.125	92±1
		WIN 0.25	82.5±0.5
		WIN 1.25	86.5±6.5
		WIN 2.5	78.3±2.4
Adult	Wistar	Vehicle	100±2.3
		WIN 0.125	91.7±1.7
		WIN 0.25	95.3±4.4
		WIN 1.25	104.3±4.7
		WIN 2.5	107.3±4.7
	SHR	Vehicle	110.1±3.2**
		WIN 0.125	97±3.6
		WIN 0.25	120.8±6.4
		WIN 1.25	87.3±5.9*
		WIN 2.5	99±5.9

\*\* $P \leq 0.05$  compared to vehicle-treated SHR adolescents; \* $P \leq 0.05$  compared to vehicle-treated SHR adults

and Wistar rats under identical experimental conditions. In the Wistar strain, included as a “normal” genetically heterogeneous population, WIN clearly produced place aversion in adults, while no effects were observed in adolescents. In contrast, in the SHR strain, WIN produced rewarding effects in both adult and adolescent rats. The selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist, AM 251, prevented the rewarding and aversive effects of WIN regardless of strain and age, indicating that these behavioral effects were mediated by CB<sub>1</sub> receptors. Furthermore, administration of WIN at doses which altered behavior did not change blood pressure in any experimental group.

It has been reported that cannabinoids can induce both rewarding and aversive responses in a variety of animal models, such as drug self-administration, intracranial self-stimulation, CPP, and reinstatement procedures. However, aversion is the predominant effect of cannabinoids (Vlachou et al. 2005). For example, in contrast to the typical effects of most drugs of abuse (e.g., cocaine and heroin), cannabinoids failed to produce self-administration behavior (Leite and Carlini 1974; Carney et al. 1977; van Ree et al. 1978; Mansbach et al. 1994), induce place aversion (Parker and Gillies 1995; McGregor et al. 1996; Sanudo-Pena et al. 1997), and increase intracranial self-

stimulation thresholds (Vlachou et al. 2005), a sign of negative affective state, in laboratory animals. Conversely, Justinova et al. (2003) have demonstrated unambiguously positive reinforcing effects of  $\Delta^9$ -THC in squirrel monkeys using the intravenous self-administration paradigm. Furthermore, in some particular experimental conditions (e.g., pre-exposure to the drug or the homeostatic state of the animal) rewarding effects of cannabinoids can be achieved (e.g., Takahashi and Singer 1979; Lepore et al. 1995; Tanda et al. 2000; Valjent and Maldonado 2000).

In our experimental conditions, adult Wistar rats clearly showed an aversion for the place previously paired with WIN, thus indicating a dysphoric effect in “normal” rats. In sharp contrast, SHR rats showed preference for the place paired with WIN, a result that can be interpreted as an increased motivation for cannabinoids in these animals. Interestingly, both the rewarding and aversive effects of WIN in SHR and Wistar rats, respectively, were mediated by CB<sub>1</sub> receptors. It has been reported that CB<sub>1</sub> receptors are involved in the primary reinforcing effects of cannabinoids, alcohol, nicotine, and opioids (Maldonado et al. 2006). In addition, these receptors are densely expressed in brain regions related to motivation and reward (Chambers et al. 2003), and play a modulatory role in the dopamine system (Robbe et al. 2002; Köfalvi and Fritzsche 2008). Thus, an altered function of the cannabinoid system in SHR rats may result in an increased sensitivity to the rewarding effects of cannabinoids. The characteristics of the brain cannabinoid system in adult SHR rats, however, remain to be investigated.

It has been reported that SHR rats present abnormalities in the dopamine system, including increased density of dopamine D<sub>2</sub>-receptors (Chiu et al. 1982), increased striatal dopamine turnover (McKeon and Hendley 1988), increased expression of dopamine transporter (Watanabe et al. 1997), and altered release of dopamine in some brain regions compared to other rat strains (Russell et al. 1995; Russell et al. 2000; Viggiano et al. 2003). Considering that dopamine dysfunction is a major factor in the etiology of both ADHD and drug addiction, alterations in this system may explain, at least in part, the ADHD-like behavior displayed by SHR rats, and eventually the rewarding effect of cannabinoids observed specifically in this strain (Vendruscolo et al. 2009). Future studies are needed to test directly the role of the dopamine system on cannabinoid-induced CPP in SHR rats.

When comparing adult and adolescent rats, it was observed herein that a moderate dose of WIN (0.25 mg/kg) induced CPP in SHR adults, whereas a tenfold-higher dose (2.5 mg/kg) elicited CPP in SHR adolescents. As with adults, the CPP effect of WIN in SHR adolescents was prevented by pre-treatment with the CB<sub>1</sub>-receptor antagonist AM 251. It is noteworthy that the behavioral effects of WIN were not dose-related. However, a non-linear dose–response relation-

ship is common in behavioral tests with cannabinoid agonists (Sanudo-Pena et al. 1997; Valjent and Maldonado 2000; Braida et al. 2004; Quinn et al. 2008). As discussed above, alterations in the cannabinoid (Adriani et al. 2003) and dopamine (Papa et al. 2002) systems that have been reported in adolescent SHR rats may contribute to the rewarding effects of cannabinoids specifically observed in these animals. In Wistar rats, WIN induced place aversion (0.25–2.5 mg/kg) in adults, whereas no effects were observed in adolescents. Taken together, these results suggest that adolescent rats were more resistant to both the rewarding and aversive properties of the cannabinoid receptor agonist WIN than adult rats. In agreement with these results, Quinn et al. (2008) have recently demonstrated that adult Wistar rats displayed a long-lasting avoidance to a  $\Delta^9$ -THC-paired environment, yet this effect was not observed in adolescent rats. On the other hand, it has been reported that adolescent rats are more sensitive than adults to enduring changes induced by drugs of abuse. For example, adolescent rats previously exposed to  $\Delta^9$ -THC showed a significant memory impairment and greater hippocampal alterations than adult rats (Quinn et al. 2008). Andersen et al. (2002) have reported that adolescent Sprague–Dawley rats, compared to adults, are more susceptible to persistent behavioral and neurobiological changes after repeated exposure to methylphenidate, a psychostimulant drug often prescribed for individuals with ADHD. With respect to SHR, repeated methylphenidate treatment during adolescence was able to decrease the place preference induced by cocaine (Augustyniak et al. 2006), but produced anxious-like behavior and enhanced ethanol intake in adult rats (Vendruscolo et al. 2008). To test whether methylphenidate influences cannabinoid-induced conditioned place preference in SHR rats is an interesting approach for future studies. Therefore, although adolescent rats appear to be more resistant to the rewarding and aversive drug effect than adult rats, they are more sensitive to the enduring drug-induced behavioral and brain changes. These effects might favor a higher drug intake during adolescence and contribute to the development of drug addiction.

The hypertension displayed by SHR rats is frequently questioned as a possible confounding factor in behavioral studies (Adriani and Laviola 2004). Thus, it was of interest in the present study to test the effects of WIN on blood pressure. The results provide evidence supporting a dissociation between the behavioral effects of WIN and blood pressure. First, WIN produced CPP in adolescent SHR rats that had not yet developed hypertension, and administration of WIN did not alter blood pressure in these animals. Second, as expected, adult SHR rats were hypertensive, yet WIN injection in the dose that produced CPP (0.25 mg/kg) did not significantly alter blood pressure. Only a fivefold-higher dose of WIN (1.25 mg/kg) produced a hypotensive effect in SHR adults. Furthermore, the blood

pressure was not significantly altered in WIN-treated adolescent and adult Wistar rats. Because some studies have reported cardiovascular effects of cannabinoids in normotensive and SHR rats (Lake et al. 1997; Batkai et al. 2004; Wheel et al. 2007) and because blood pressure measurements in the present study were carried out in anesthetized rats, the influence of blood pressure on the behavioral effects of WIN cannot be completely ruled out.

Previous research has shown that WIN at doses of 0.25 and 1.25 mg/kg selectively promoted locomotor stimulation in adolescent SHR in the open field test (Pandolfo et al. 2007). Indeed, WIN at doses that increased locomotion in our previous studies did not induce place preference in the present study. Moreover, it is important to note here that our rats were tested in a drug-free state. More specifically, these observations indicate that locomotor activity was not a confounding factor in the interpretation of the present results.

In conclusion, the present findings indicate that the cannabinoid receptor agonist WIN produces opposite behavioral effects in the SHR and Wistar strains. We have demonstrated for the first time that cannabinoids induced rewarding effects in adolescent and adult SHR rats. This result also confirms and extends previous research that demonstrates the aversive effects of cannabinoids in adult Wistar rats and a resistance to these effects in adolescent rats. In addition, the behavioral effects of WIN were mediated by CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors and not related to hypertension. Taken together, these results suggest that both adolescence and the ADHD-like profile exhibited by the SHR strain may constitute factors that alter the motivational properties of cannabinoids. Although additional research is necessary, the SHR strain may constitute a useful tool for the study of the behavioral aspects underlying the relationship between ADHD and cannabis vulnerability.

**Acknowledgments** The authors are grateful to Dr. Jamil Assrey for his expert assistance in blood pressure measurements and to Dr. Attila Köfalvi and Dr. Kelly J. Clemens for helpful comments. P.P. and R.S. are supported by scholarships from CNPq, Brazil. L.F.V. had a post-doctoral fellowship from FONDATION FYSSEN, France. R.N.T. is the holder of a CNPq fellowship.

## References

- Adriani W, Laviola G. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol.* 2004;15:341–352.
- Adriani W, Seta DD, Dessi-Fulgheri F, Farabolini F, Laviola G. Altered profiles of spontaneous novelty seeking, impulsive behavior, and response to D-amphetamine in rats perinatally



- exposed to bisphenol A. *Environ Health Perspect*. 2003;111:395–401.
- Andersen SL, Arvanitogiannis A, Pliakas AM, LeBlanc C, Carlezon WA Jr. Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. *Nat Neurosci*. 2002;5:13–14.
- Augustyniak PN, Kourrich S, Rezazadeh SM, Stewart J, Arvanitogiannis A. Differential behavioral and neurochemical effects of cocaine after early exposure to methylphenidate in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Res*. 2006;167:379–382.
- Batkai S, Pachter P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J, et al. Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation*. 2004;110:1996–2002.
- Biederman J, Faraone SV, Spencer T, Wilens T, Mick E, Lapey KA. Gender differences in a sample of adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Res*. 1994;53:13–29.
- Biederman J, Monuteaux MC, Mick E, Spencer T, Wilens TE, Silva JM, et al. Young adult outcome of attention deficit hyperactivity disorder: a controlled 10-year follow-up study. *Psychol Med*. 2006;36:167–179.
- Braida D, Iosue S, Pegorini S, Sala M. Delta9-tetrahydrocannabinol-induced conditioned place preference and intracerebroventricular self-administration in rats. *Eur J Pharmacol*. 2004;506:63–69.
- Carney JM, Uwaydah IM, Balster RL. Evaluation of a suspension system for intravenous self-administration studies of water-insoluble compounds in the rhesus monkey. *Pharmacol Biochem Behav*. 1977;7:357–364.
- Chambers RA, Taylor JR, Potenza MN. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *Am J Psychiatry*. 2003;160:1041–1052.
- Chiu P, Rajakumar G, Chiu S, Kwan CY, Mishra RK. Enhanced [3H] spiperidol binding in striatum of spontaneously hypertensive rat (SHR). *Eur J Pharmacol*. 1982;82:243–244.
- Crews F, He J, Hodge C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007;86:189–199.
- Crowley TJ, Macdonald MJ, Whitmore EA, Mikulich SK. Cannabis dependence, withdrawal, and reinforcing effects among adolescents with conduct symptoms and substance use disorders. *Drug Alcohol Depend*. 1998;50:27–37.
- Da Silva GE, Vendruscolo LF, Takahashi RN. Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 2005;77:693–706.
- Daivids E, Zhang K, Tarazi FI, Baldessarini RJ. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Brain Res Brain Res Rev*. 2003;42:1–21.
- Deiana S, Fattore L, Spano MS, Cossu G, Porcu E, Fadda P, et al. Strain and schedule-dependent differences in the acquisition, maintenance and extinction of intravenous cannabinoid self-administration in rats. *Neuropharmacology*. 2007;52:646–654.
- Fattore L, Cossu G, Martellotta CM, Fratta W. Intravenous self-administration of the cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55, 212-2 in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;156:410–416.
- Gardner EL, Paredes W, Smith D, Donner A, Milling C, Cohen D, et al. Facilitation of brain stimulation reward by delta 9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)*. 1988;96:142–144.
- Himelstein J, Newcorn JH, Halperin JM. The neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Front Biosci*. 2000;5:461–478.
- Hoffmann O, Plesan A, Wiesenfeld-Hallin Z. Genetic differences in morphine sensitivity, tolerance and withdrawal in rats. *Brain Res*. 1998;806:232–237.
- Justinova Z, Tanda G, Redhi GH, Goldberg SR. Self-administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;169:135–140.
- Köfalvi A, Fritzsche M (2008) The Endocannabinoid System is a Major Player in Schizophrenia. In: Köfalvi, A. (Ed.), *Cannabinoids and the Brain*. Springer US, pp. 485–528. doi:10.1007/978-0-387-74349-3\_22
- Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR, Kunos G. Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;281:1030–1037.
- Leite JR, Carlini EA. Failure to obtain “cannabis-directed behavior” and abstinence syndrome in rats chronically treated with cannabis sativa extracts. *Psychopharmacologia*. 1974;36:133–145.
- Lepore M, Vorel SR, Lowinson J, Gardner EL. Conditioned place preference induced by delta 9-tetrahydrocannabinol: comparison with cocaine, morphine, and food reward. *Life Sci*. 1995;56:2073–2080.
- Maharajan P, Maharajan V, Ravagan G, Paino G. The weaver mutant mouse: a model to study the ontogeny of dopamine transmission systems and their role in drug addiction. *Prog Neurobiol*. 2001;64:269–276.
- Maldonado H, Valverde O, Berrendero F. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci*. 2006;29:225–232.
- Mansbaech RS, Nicholson KL, Martin BR, Balster RL. Failure of Delta (9)-tetrahydrocannabinol and CP 55, 940 to maintain intravenous self-administration under a fixed-interval schedule in rhesus monkeys. *Behav Pharmacol*. 1994;5:219–225.
- Martellotta MC, Cossu G, Fattore L, Gessa GL, Fratta W. Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55, 212-2 in drug-naive mice. *Neuroscience*. 1998;85:327–330.
- McGregor IS, Issakidis CN, Prior G. Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55, 940 in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996;53:657–664.
- McKeon TW, Hendley ED. Brain monoamines and metabolites in hypertensive and hypotensive rat strains. *Clin Exp Hypertens*. 1988;10:971–994.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963;27:282–293.
- Pamplona FA, Prediger RD, Pandolfo P, Takahashi RN. The cannabinoid receptor agonist WIN 55, 212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;188:641–649.
- Pamplona FA, Vendruscolo LF, Takahashi RN. Increased sensitivity to cocaine-induced analgesia in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). *Behav Brain Funct*. 2007;3:9.
- Pandolfo P, Pamplona FA, Prediger RD, Takahashi RN. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55, 212-2. *Eur J Pharmacol*. 2007;563:141–148.
- Papa M, Diewald L, Carey MP, Esposito FJ, Gironi Carnevale UA, Sadile AG. A rostro-caudal dissociation in the dorsal and ventral striatum of the juvenile SHR suggests an anterior hypo- and a posterior hyperperfusion mesocorticolimbic system. *Behav Brain Res*. 2002;130:171–179.
- Parker LA, Gillies T. THC-induced place and taste aversions in Lewis and Sprague-Dawley rats. *Behav Neurosci*. 1995;109:71–78.
- Quinn HR, Matsumoto I, Callaghan PD, Long LE, Arnold JC, Gunasekaran N, et al. Adolescent rats find repeated delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:1113–1126.
- Ramos A, Kangerski AL, Basso PF, Da Silva Santos JE, Assreuy J, Vendruscolo LF, et al. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as

- a genetic model for the study of anxiety and pain. *Behav Brain Res.* 2002;129:113–123.
- Robbe D, Kopf M, Remaury A, Boekaert J, Manzoni OJ. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:8384–8388.
- Russell V, de Villiers A, Sagvolden T, Lamm M, Taljaard J. Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* 1995;676:343–351.
- Russell VA, de Villiers AS, Sagvolden T, Lamm MC, Taljaard JJ. Methylphenidate affects striatal dopamine differently in an animal model for attention-deficit/hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res Bull.* 2000;53:187–192.
- Russell VA, Sagvolden T, Johansen EB. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct.* 2005;1:9.
- Sagvolden T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neurosci Biobehav Rev.* 2000;24:31–39.
- Sagvolden T, Russell VA, Aase H, Johansen EB, Farshbaf M. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 2005;57:1239–1247.
- Sanudo-Pena MC, Tsou K, Delay ER, Hohman AG, Force M, Walker JM. Endogenous cannabinoids as an aversive or counter-rewarding system in the rat. *Neurosci Lett.* 1997;223:125–128.
- Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000;24:417–463.
- Spear LP, Brake SC. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol.* 1983;16:83–109.
- Takahashi RN, Singer G. Self-administration of delta 9-tetrahydrocannabinol by rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1979;11:737–740.
- Tanda G, Munzar P, Goldberg SR. Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nat Neurosci.* 2000;3:1073–1074.
- Taylor E. Clinical foundations of hyperactivity research. *Behav Brain Res.* 1998;94:11–24.
- Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol.* 2007;12:227–462.
- Valjent E, Maldonado R. A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2000;147:436–438.
- van Ree JM, Slangen JL, de Wied D. Intravenous self-administration of drugs in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1978;204:547–557.
- Vendruscolo LF, Izidio GS, Takahashi RN, Ramos A. Chronic methylphenidate treatment during adolescence increases anxiety-related behaviors and ethanol drinking in adult spontaneously hypertensive rats. *Behav Pharmacol.* 2008;19:21–27.
- Vendruscolo LF, Izidio GS, Takahashi RN. Drug reinforcement in a rat model of attention deficit/hyperactivity disorder – the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Current Drug Abuse Reviews.* 2009, in press
- Viggiano D, Vallone D, Ruocco LA, Sadile AG. Behavioural, pharmacological, morpho-functional molecular studies reveal a hyperfunctioning mesocortical dopamine system in an animal model of attention deficit and hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003;27:683–689.
- Vlachou S, Nomikos GG, Panagis G. CB1 cannabinoid receptor agonists increase intracranial self-stimulation thresholds in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 2005;179:498–508.
- Vlachou S, Nomikos GG, Stephens DN, Panagis G. Lack of evidence for appetitive effects of Delta 9-tetrahydrocannabinol in the intracranial self-stimulation and conditioned place preference procedures in rodents. *Behav Pharmacol.* 2007;18:311–319.
- Watanabe Y, Fujita M, Ito Y, Okada T, Kusuoaka H, Nishimura T. Brain dopamine transporter in spontaneously hypertensive rats. *J Nucl Med.* 1997;38:470–474.
- Wheal AJ, Bennett T, Randall MD, Gardiner SM. Cardiovascular effects of cannabinoids in conscious spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2007;152:717–724.
- Zangen A, Solinas M, Ikemoto S, Goldberg SR, Wise RA. Two brain sites for cannabinoid reward. *J Neurosci.* 2006;26:4901–4907.

## **Apêndice IV**

### **Comunicação oral (palestra) de parte dos resultados desta tese em congresso internacional:**

Role of adenosine receptors in the control of cannabinoid-induced addiction in rodents. 29th European Winter Conference on Brain Research – EWCBR, 2009, Les Menuires - França.

### **Apresentação em forma de pôster de parte dos resultados desta tese em congresso internacional:**

PANDOLFO P, Pires VA, Cunha RA, Takahashi, RN. Role of Adenosine A2A Receptors in the Control of Cannabinoid-Induced Place Preference in Rats. 11th Meeting of the Portuguese Society for Neuroscience, 2009, Braga - Portugal. *Frontiers in Neuroscience*.

PANDOLFO P, Ferreira SG, Köfalvi A. Synthetic cannabinoids inhibit the dopamine transporter whereby increasing stimulated presynaptic net dopamine release in the rat striatum. 11th Meeting of the Portuguese Society for Neuroscience, 2009, Braga - Portugal. *Frontiers in Neuroscience*.

PANDOLFO P, Pires VA, Takahashi RN. Involvement of adenosine and dopamine receptors in the rewarding properties of a cannabinoid agonist in rats. XXVI Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, 2008, Munique - Alemanha.

PANDOLFO P, Vendruscolo LF, Pamplona FA, Prediger RDS, Takahashi R N. Rewarding and aversive properties of the cannabinoid agonist WIN 55,212-2: Influence of the age and rat strain. 16th International Behavioral Neuroscience Society (IBNS), 2007, Rio de Janeiro - Brasil.

### **Premiações concedidas e relacionadas aos resultados desta tese:**

Auxílio financeiro – “40th Reunião Anual da Society for Neuroscience – SfN” em San Diego – EUA, 2010. Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento.

Menção honrosa – PANDOLFO P, Machado N, Köfalvi A, Cunha RA, Takahashi RN. Caffeine regulates corticostriatal dopamine transporter density and improves attention deficits in a animal model of attention deficit hyperactivity disorder. XXXIV Congresso anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento – SBNeC, 2010

Prêmio JOVEM PESQUISADOR DE DOUTORADO concedido pela Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (Senad) e pelo Governo da República Portuguesa. Palácio do Planalto, Brasília, 2007.

