



Vanessa Aranega Pires

**Antagonistas adenosinérgicos revertem prejuízos cognitivos
em modelo animal do transtorno de déficit de atenção**

**Florianópolis – SC
2008**



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

**Antagonistas adenosinérgicos revertem prejuízos cognitivos
em modelo animal do transtorno de déficit de atenção**

Vanessa Aranega Pires

Florianópolis – SC
2008



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

Vanessa Aranega Pires

**Antagonistas adenosinérgicos revertem prejuízos cognitivos em modelo animal
do transtorno de déficit de atenção**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção de título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto
Takahashi

**Florianópolis – SC
2008**

*Aos meus pais, Lourdes e José Wilson, por todo o amor,
carinho, incentivo e dedicação; e em especial
à minha avó Terezinha pela realização
deste sonho, amo muito vocês !*

**“ São futeis e cheias de erros
as ciências que não nasceram da
experimentação, mãe de todo
conhecimento.”**

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Lourdes e Wilson, seres humanos admiráveis, que exalam bondade e sempre abriram mão dos próprios sonhos para realização dos meus. Pessoas que tento seguir, mas que não consigo chegar aos pés. Meu porto seguro, conselheiros e maiores incentivadores;

Aos meus avôs paternos Terezinha e José, e também aos maternos Nair e Gines, por não terem poupado amor e dedicação durante grande parte da minha criação, eles infelizmente já se foram, mas certamente estão felizes por mais esta etapa vencida;

A minha irmã Izadora, que nasceu para completar a minha vida e me mostrar o quanto o mundo pode ser diferente, ela que sempre vibra com as minhas vitórias e apesar de crescida será sempre a minha pequena;

Ao Professor Dr. Reinaldo Naoto Takahashi, pelos 4 anos de convívio e orientação, por ter me aceitado em seu laboratório como aluna de iniciação científica e ter me incentivado a continuar e hoje estar aqui;

Aos meus padrinhos Fátima e Martin, que sempre foram meus segundos pais e dividiram comigo cada etapa da minha vida, seres iluminados os quais sempre terei respeito e admiração e também a minha prima e hoje afilhada Taciana;

A D. Ilze e Sr. Lídio, os pais que me acolheram quando eu ainda uma menina cheguei a Florianópolis, e com carinho e amor me incentivaram a continuar e a aprender a crescer com os meus próprios erros;

A Ana Luisa e a Lisiane, com quem divido minhas alegrias e tristezas todos os dias ao chegar em casa, amigas que amenizam a saudade que sinto de casa e são minha família em Florianópolis;

As velhas e eternas amigas, Bárbara, Débora, Luana, Maísa, Marina, Taisinha, Thalita, Thânea, as quais morro de saudades, mas que sempre estão presentes em meus pensamentos e me recebem de braços abertos a cada reencontro, apesar de estarmos tão longe e muito gratificante perceber que a nossa amizade continua a mesma;

A minha irmã do coração Luana, a irmã que a vida me permitiu escolher, a irmã que mesmo a quilômetros de distância dividiu comigo cada momento vivido nestes 6 anos longe de casa e que muitas vezes foi a minha maior conselheira, mesmo que pelo telefone ou pela internet;

As minhas grandes amigas da faculdade, Ana Elisa, Caroline, Denise, Gabriela, Júlia e Stela, Suelen que dividiram comigo os melhores anos da minha vida, as amigas que ganhei como presente de formatura, algumas já tomaram seu caminho, outras ainda estão próximas

de mim, mas todas estão guardadas com muito carinho dentro da minha memória e do meu coração;

As amigas que surgiram logo após o término da faculdade, no período em que me senti mais sozinha, já que a “turma” da faculdade não existia mais, as amigas que são tão recentes, mas parecem que conheço desde que nasci, amigas pra todas as horas, amigas que sempre serão amigas, as minhas amoras Aline, Betina, Cristiane, Franciane, Lisiane, Márcia e Nicolle;

Aos meus amigos que não se enquadram a nenhuma das outras coleções de amigos, mas que possuem uma participação não menos especial na minha vida, pessoas que pra sempre vou amar, Ana Paula, Daniela, Emerson, Fernanda, Flavinha, Gustavo, Moises e Roberto;

Ao professor Dr. Rui Daniel Prediger, por me apoiar e também orientar durante os obstáculos encontrados no percurso;

Aos demais professores do Curso de Pós Graduação em Farmacologia, que sempre me guiaram com entusiasmo e competência;

Aos colegas e ex-colegas do laboratório Aderbal, Daniel Rial, Fabrício Assini, Fabrício Pamplona, Leandro, Luciano, Pablo, Rafael e em especial a Cristiane e Meigy pela amizade durante estes anos de convívio;

A minha amiga Meigy, pelas infinitas ajudas durante todo o mestrado, por estar sempre pronta para ajudar independente do dia ou da hora e também pela agradável companhia;

Aos amigos e colegas da “Farmaco”, pelas conversas e risadas nos corredores, pelos apoios sempre que precisei, pelos congressos, encontros fora da farmacologia e pela agradável companhia;

Aos colaboradores Cláudia, Daniel, Pablo, Pamplona e Rui pelas discussões que ajudaram a realizar este trabalho;

Aos demais e funcionários do Curso de Pós Graduação em Farmacologia, por terem de alguma forma contribuído para a realização deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro;

Acima de tudo e de todos agradeço a Deus, que em sua onipresença regeu minha vida, dando-me amparo e equilíbrio nos momentos em que mais precisei. Minha eterna gratidão.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Drogas.....	20
3.3. Procedimentos experimentais	21
3.3.1. Reconhecimento de objetos	21
3.3.2. Locomoção	26
3.3.3. Peso Corporal	26
3.3.4. Pressão arterial.....	26
3.3.5. Reação de Imuno-histoquímica	27
3.4. Análise estatística	30
4. RESULTADOS	32
4.1. Comparação entre as linhagens WIS e SHR no teste do reconhecimento de objetos	32
4.2. Efeitos da administração aguda de metilfenidato ou de cafeína na performance de ratos machos WIS e SHR no teste de reconhecimento de objetos	36

4.3. Efeitos da administração aguda de metilfenidato ou de cafeína na performance de ratos fêmeas WIS e SHR no teste de reconhecimento de objetos	39
4.4. Efeitos 24 horas após a administração aguda de metilfenidato ou de cafeína no teste de reconhecimento de objetos em ratos fêmeas WIS e SHR	43
4.5. Efeitos da administração aguda de antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos A1 e A2A no teste de reconhecimento de objetos em ratos fêmeas WIS e SHR.....	46
4.6. Efeitos da administração aguda de metilfenidato, cafeína e de antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos A1 e A2A na pressão arterial de ratos fêmeas WIS e SHR	49
4.7. Efeitos do tratamento repetido com metilfenidato ou cafeína, durante a idade adulta, no teste de reconhecimento de objetos, em ratos fêmeas WIS e SHR.....	53
4.8. Efeitos do tratamento repetido com metilfenidato ou cafeína, no teste de reconhecimento de objetos, durante a adolescência, de ratos fêmeas WIS e SHR.....	56
4.9. Efeitos do tratamento repetido com metilfenidato ou cafeína, durante a idade adulta ou durante a adolescência, na pressão arterial de ratos fêmeas WIS e SHR	60
4.10. Efeitos do tratamento repetido com metilfenidato ou cafeína, durante a idade adulta ou durante a adolescência, sob o peso corporal de ratos fêmeas WIS e SHR	63
4.11. Análise imuno-histoquímica para expressão de receptores de adenosina A1 e A2A em cérebros de ratos fêmeas adultos das linhagens WIS e SHR.....	66
5. DISCUSSÃO.....	69

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de receptores adenosinérgicos	10
Figura 2 – Representação esquemática da expressão de receptores adenosinérgico... 11	
Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de ação do metilfenidato.....5	
Figura 4 - Vista lateral dos três objetos utilizados no modelo de reconhecimento de objeto.	22
Figura 5 – Representação da fase de habituação (campo aberto).....	23
Figura 6 – Representação da fase de apresentação aos objetos.....	24
Figura 7 – Representação da fase de reconhecimento dos objetos.....	25
Figura 8 – Comparação entre ratos machos WIS e SHR no teste de reconhecimento de objetos.....	33
Figura 9 – Comparação entre ratos fêmeas WIS e SHR no teste de reconhecimento de objetos.....	35
Figura 10 – Efeitos da administração de metilfenidato e de cafeína, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos machos WIS e SHR, no teste de reconhecimento do objeto.....	37
Figura 11 – Efeitos da administração de metilfenidato e de cafeína, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas WIS e SHR, no teste de reconhecimento do objeto.	40

Figura 12 – Efeitos da administração de metilfenidato e de cafeína, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento, realizado 24 horas após a fase de apresentação aos objetos (B), em ratos fêmeas WIS e SHR, no teste de reconhecimento do objeto.....	45
Figura 13 – Efeitos da administração de antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos A1 - DPCPX e A2A – ZM241385, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas WIS e SHR, no teste de reconhecimento do objeto.....	47
Figura 14 – Efeitos da administração de metilfenidato e de cafeína, sob a pressão arterial, em ratos fêmeas WIS e SHR.....	50
Figura 15 – Efeitos da administração de antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos A1 - DPCPX e A2A – ZM241385 sob a pressão arterial, em ratos fêmeas WIS e SHR.....	51
Figura 16 – Efeitos da administração repetida, de metilfenidato e de cafeína, durante a idade adulta no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas WIS e SHR, no teste de reconhecimento do objeto.....	54
Figura 17 – Efeitos da administração repetida, durante a idade adulta, de metilfenidato e de cafeína na atividade locomotora de ratos WIS e SHR fêmeas durante a fase de apresentação dos objetos, no teste do reconhecimento de objetos.....	55
Figura 18 – Efeitos da administração repetida, de metilfenidato e de cafeína, durante a adolescência, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas adultos WIS e SHR, no teste de reconhecimento do objeto.	58
Figura 19 – Efeitos da administração repetida, durante a adolescência, de metilfenidato e de cafeína na atividade locomotora de ratos fêmeas WIS e SHR durante a fase de apresentação dos objetos, no teste do reconhecimento de objetos.	59
Figura 20 – Efeitos da administração repetida, durante a idade adulta, de metilfenidato e de cafeína, sob a pressão arterial em ratos fêmeas adultos WIS e SHR.....	61

Figura 21 – Efeitos da administração repetida, durante a adolescência, de metilfenidato e de cafeína, sob a pressão arterial em ratos fêmeas adultos WIS e SHR.....	62
Figura 22 – Efeitos da administração repetida, durante a adolescência (A), ou durante a idade adulta (B) de metilfenidato e de cafeína, sob o ganho de peso corporal em ratos fêmeas adultos WIS e SHR.....	65
Figura 23 – Figura da expressão de receptores de adenosina A1, através de análises de imunohistoquímica, no hipocampo e no córtex parietal de ratos WIS e SHR.....	67
Figura 24 – Figura da expressão de receptores de adenosina A2A, através de análises de imunohistoquímica, no hipocampo, córtex parietal e no estriado de ratos WIS e SHR.....	68
Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de ação do metilfenidato (elaborada por Rial, 2008).	5
Figura 2 - Representação esquemática de receptores adenosinérgicos (elaborado por Rial, 2008).	10
Figura 3 – Representação esquemática da expressão de receptores adenosinérgico, (adaptado de Ribeiro <i>et al.</i> , 2003).....	11
Figura 4 - Vista lateral dos três objetos que foram utilizados no modelo de reconhecimento do objeto.	22
Figura 5 – Representação da fase de habituação (campo aberto).....	23
Figura 6 – Representação da fase de apresentação aos objetos.....	24

Figura 7 – Representação da fase de reconhecimento dos objetos.....	25
Figura 8 – Comparação entre ratos machos WIS e SHR adultos no teste de reconhecimento de objetos.....	33
Figura 9 – Comparação entre ratos fêmeas WIS e SHR adultos no teste de reconhecimento de objetos.....	35
Figura 10 – Efeitos da administração de veiculo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 1, 3 e 10 mg/kg, 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos machos WIS e SHR adultos, no teste de reconhecimento do objeto.....	37
Figura 11 – Efeitos da administração de veiculo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 1, 3 e 10 mg/kg, 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas WIS e SHR adultos, no teste de reconhecimento do objeto.....	40
Figura 12 – Efeitos da administração de V, MFD 2 mg/kg e de cafeína CAF 3 mg/kg, 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento, realizado 24 horas após a fase de apresentação aos objetos (B), em ratos fêmeas WIS e SHR adultos, no teste de reconhecimento do objeto.....	45
Figura 13 – Efeitos da administração de antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos A1 - DPCPX (1, 3 e 5 mg/kg) e A2A – ZM241385 (0,5 e 1 mg/kg) e também da administração combinada de DPCPX (3 mg/kg) e ZM (0,5 mg/kg) (MIX), 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas WIS e SHR, no teste de reconhecimento do objeto.....	47

Figura 14 – Efeitos da administração (i.p.) V, MFD (2 mg/kg) ou CAF (1, 3 e 10 mg/kg), sob a pressão arterial (média \pm E.P.M., in mmHg), em ratos fêmeas WIS e SHR. # $p < 0,05$ comparado aos ratos WIS controle. (n = 4).....	50
Figura 15 – Efeitos da administração (i.p.) de solução veiculo ou dos antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos A1 - DPCPX (1, 3 e 5 mg/kg) e A2A – ZM241385 (0,5 e 1 mg/kg) e também da associação das doses de 3 mg/kg de DPCPX e de 0,5 mg/kg de ZM241385 (MIX), sob a pressão arterial (média \pm E.P.M., in mmHg), em ratos fêmeas WIS e SHR. # $p < 0,05$ comparado aos ratos WIS controle. (n = 3 - 4).....	51
Figura 16 – Efeitos da administração (i.p.) repetida (14 dias), de veiculo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg, durante a idade adulta no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas WIS e SHR, no teste de reconhecimento do objeto.	54
Figura 17 – Efeitos da administração (i.p.) repetida (14 dias) durante a idade adulta, de veiculo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg na atividade locomotora de ratos WIS e SHR fêmeas durante a fase de apresentação dos objetos, no teste do reconhecimento de objetos. (n = 8 – 10).....	55
Figura 18 – Efeitos da administração (i.p.) repetida (14 dias), de veiculo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg, durante adolescência, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas adultos WIS e SHR adultos, no teste de reconhecimento do objeto.....	58
Figura 19 – Efeitos da administração (i.p.) repetida (14 dias) durante a adolescência, de veiculo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg na atividade locomotora de ratos fêmeas WIS e SHR adultos, durante a fase de apresentação dos objetos, no teste do reconhecimento de objetos. (n = 10 -12).....	59

Figura 20 – Efeitos da administração (i.p.) repetida, durante a idade adulta, de veiculo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg, sob a pressão arterial (média \pm E.P.M., in mmHg), em ratos fêmeas WIS e SHR adultos. # $p < 0,05$ comparado aos ratos WIS tratados com V, * $p < 0,05$ comparado aos ratos SHR tratados com V.	61
Figura 21 – Efeitos da administração (i.p.) repetida, durante a adolescência, de veiculo, V, metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg, sob a pressão arterial (média \pm E.P.M., in mmHg), em ratos fêmeas WIS e SHR adultos. # $p < 0,05$ comparado aos ratos WIS tratados com veiculo.	62
Figura 22 – Efeitos da administração (i.p.) repetida, durante a idade adulta (A) ou durante a adolescência (B) de veiculo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg, sob o ganho de peso corporal (média \pm E.P.M.), em ratos fêmeas adultos WIS e SHR.....	65
Figura 23 – Figura representativa da expressão de receptores de adenosina A1, através de análises de imuno-histoquímica, na região do hipocampo - 4X (A), sub-regiões hipocâmpais CA1 - 20X(B), CA2 - 20X(C), CA3 - 20X (D) e GD - 20X (E), no córtex parietal - 20X (F) de ratos WIS e SHR.	67
Figura 24 – Figura representativa da expressão de receptores de adenosina A2A, através de análises de imuno-histoquímica, no hipocampo - 4X (A e B), córtex parietal - 20X(C e D) e no estriado - 40X (E e F) de ratos WIS e SHR.	68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Efeitos da administração (i.p.) de veiculo, metilfenidato ou cafeína, 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, na atividade locomotora de ratos machos WIS e SHR38
- Tabela 2** – Efeitos da administração (i.p.) de veiculo, metilfenidato ou cafeína, 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, na atividade locomotora de ratos fêmeas WIS e SHR.....42
- Tabela 3** – Efeitos da administração (i.p.) de veiculo ou de antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos A1 - DPCPX e A2A – ZM241385, 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, na atividade locomotora de ratos fêmeas WIS e SHR49

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
CA	campo aberto
CAF	cafeína
DA	dopamina
DMSO	dimetilsulfoxido
i.p.	intraperitoneal
MAO	monoamino-oxidase
MFD	metilfenidato
MIX	DPCPX (3 mg/kg) e ZM241385 (0,5 mg/kg)
PN	pós-natal
SHR	ratos espontaneamente hipertensos
SNC	sistema nervoso central
TDAH	transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
WIS	wistar
WKY	wistar Kyoto
V	solução veículo

RESUMO

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns em crianças e adolescentes, afetando cerca de 2 a 12% das crianças em idade escolar. A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tem sido utilizada como principal modelo animal para o estudo deste transtorno, já que estes animais apresentam características comportamentais (hiperatividade, impulsividade e prejuízo atencional) e neuroquímicas semelhantes às observadas neste transtorno em humanos. Trabalhos recentes demonstraram que a administração de cafeína, um antagonista adenosinérgico não seletivo, reverteu os prejuízos apresentados pelos ratos SHR nas tarefas de aprendizado espacial e de memória social. Sendo assim o objetivo do presente estudo foi caracterizar o prejuízo apresentado por ratos SHR machos e fêmeas na tarefa de reconhecimento de objetos quando comparados aos ratos Wistar (WIS). Investigamos ainda o efeito agudo do metilfenidato, cafeína e de antagonistas seletivos de receptores adenosinérgicos na idade adulta e também o efeito da administração repetida de metilfenidato e cafeína na idade adulta ou durante a adolescência. Os resultados demonstraram que os ratos WIS discriminam todos os objetos apresentados, enquanto que os ratos SHR discriminam apenas os objetos com grandes diferenças estruturais. Foi também observado que o tratamento intraperitoneal com metilfenidato (2 mg/kg), cafeína (1-10 mg/kg), antagonistas adenosinérgicos seletivos para receptores A1 - DPCPX (5 mg/kg), antagonistas adenosinérgicos seletivos para receptores A2A - ZM241385 (1 mg/kg) e também a associação de doses não efetivas de DPCPX (3 mg/kg) + ZM241385 (0,5 mg/kg) na idade adulta reverteram o prejuízo apresentado pelos ratos SHR na tarefa de reconhecimentos de objetos, sem alterar a atividade locomotora ou a hipertensão apresentada por esses animais. Além disso, o tratamento repetido de metilfenidato (2 mg/kg) ou cafeína (3 mg/kg) durante a idade adulta ou durante a adolescência reverteram de forma persistente o prejuízo apresentado nesta tarefa pelos ratos SHR, no entanto a administração de ambas as drogas durante a adolescência causou prejuízo na capacidade discriminatória dos ratos WIS quando testados na idade adulta. Surpreendentemente não ocorreram diferenças entre as linhagens, na expressão de receptores adenosinérgicos do subtipo A1 e A2A avaliada através da técnica de imuno-histoquímica. Estes resultados sugerem que o desempenho dos ratos SHR na tarefa de reconhecimento de objetos parece estar relacionado com prejuízos no aprendizado discriminatório, aos déficits atencionais e não com a capacidade de armazenar informações. O presente estudo demonstra também que os antagonistas seletivos e não seletivos de receptores adenosinérgicos revertem o prejuízo apresentado pelos ratos SHR, sendo que os efeitos da administração repetida destas drogas podem persistir mesmo após o término do tratamento, sugerindo assim o potencial destas drogas para o tratamento dos prejuízos cognitivos associados ao TDAH.

ABSTRACT

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most common childhood psychiatric disorders, affecting between 2 and 12% of primary-school children. The spontaneously hypertensive rat (SHR) is considered a genetic model for the study of this disorder since it displays behavioral and neurochemical characteristics of ADHD. Recent studies demonstrated that administration of the non selective adenosine receptor antagonist caffeine improved memory impairments in SHR rats. Therefore the objective of this study was to investigate whether adult male and female SHR exhibit altered short-term object recognition abilities compared to Wistar rats (WIS). The acute effects of methylphenidate, caffeine, or selective adenosine receptor antagonists in the performance of adults WIS and SHR rats in the object recognition task and the effects of repeated administration of methylphenidate and caffeine in adult age and adolescence were also evaluated. The results show that WIS rats displayed discrimination ability for all the objects employed while, SHR only discriminated “distinct” pairs of objects, they were not able to discriminate pairs of objects with subtle structural differences. In addition, the acute intraperitoneal (i.p.) injection of methylphenidate (2 mg/kg), caffeine (1–10 mg/kg), the selective adenosine A₁ receptor antagonist DPCPX (5 mg/kg), the selective adenosine A_{2A} receptor antagonist ZM241385 (1.0 mg/kg) or association with low doses with DPCPX (3 mg/kg) and ZM242385 (0,5 mg/kg), reversed the impairment of object recognition in SHR, without altering the locomotion or hypertensive state. The repeated treatment with methylphenidate (2 mg/kg) and caffeine (3 mg/kg) in the adult age or in adolescence improved the object recognition deficits in the SHR rats. However, in WIS rats these treatments during adolescence impaired the recognition task. Interestingly, no major differences in the immunoreactivity of adenosine A₁ and A_{2A} receptors were observed in brain areas of WIS and SHR rats. These findings suggest that the previously described inability of SHR in cognitive paradigm may not be associated with their capacity to store information for short-term periods but rather may reflect discriminative learning impairments associated with attentional deficits. The present work also shows that selective and non selective adenosine receptors antagonists improved the cognitive impairment in SHR rats. Moreover, the effects of repeated administration of these drugs were persistent after the end of treatment, suggesting the potential of adenosinergic drugs for the treatment of cognitive impairment associated to ADHD.

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSTORNO DO DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH)

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns em crianças e adolescentes, afetando cerca de 2 a 12% das crianças mundiais em idade escolar (Sagvolden *et al.*, 2005). Este transtorno costuma manifestar-se em idade inferior a 7 anos, e cerca de 20 a 30% dos indivíduos que apresentaram TDAH na infância ou adolescência continuam com a patologia na idade adulta (Muglia *et al.*, 2000). No entanto, o mais comum é que os sintomas de hiperatividade desapareçam com o tempo, permanecendo apenas os sintomas relacionados ao déficit de atenção (Swanson *et al.*, 1998). Essa desordem em crianças é mais comum em meninos do que em meninas, porém quando analisados o gênero dos pacientes que apresentaram os sintomas durante a infância ou adolescência e continuam apresentando na idade adulta o número de mulheres é maior do que o de homens (Biederman *et al.*, 1994; Muglia *et al.*, 2000).

O primeiro relato não científico utilizado para ilustrar o TDAH é o poema de 1865 “Felipe o inquieto” do médico alemão Heinrich Hoffman. Já as primeiras referências aos transtornos hipercinéticos na literatura médica aparecem na metade do século XIX. Entretanto, somente no início do século XX começou-se a descrever o quadro clínico de uma maneira mais sistemática (Petry, 1999).

Apesar do grande número de estudos já realizados, as causas precisas do TDAH ainda não são conhecidas. Entretanto, a influência de fatores genéticos e ambientais no seu

1 desenvolvimento é amplamente aceita na literatura (Tannock, 1998; Thapar *et al.*, 1999). A
2 procura pela associação entre TDAH e complicações na gestação ou no parto tem resultado em
3 conclusões divergentes, mas tende a suportar a idéia de que tais complicações (toxemia,
4 eclampsia, pós-maturidade fetal, duração do parto, estresse fetal, baixo peso ao nascer,
5 hemorragia pré-parto, má saúde materna) predisponham ao transtorno (Faraone e Bierderman,
6 1998). Recentemente, Mick *et al.* (2002) documentaram uma associação significativa entre
7 exposição a fumo e álcool durante a gravidez e a presença de TDAH nos filhos, a qual se
8 manteve mesmo após controle para psicopatologia familiar (incluindo TDAH), adversidades
9 sociais e comorbidade com transtorno de conduta. Outros fatores, como danos cerebrais
10 perinatais no lobo frontal, podem afetar processos de atenção, motivação e planejamento,
11 relacionando-se indiretamente com a doença (Levy *et al.*, 1998). É importante ressaltar que a
12 maioria dos estudos sobre possíveis agentes ambientais apenas evidenciaram uma associação
13 desses fatores com o TDAH, não sendo possível estabelecer uma relação clara de causa e efeito
14 entre eles (Faraone e Biederman, 1998).

15 Apesar dos critérios de diagnóstico ainda não estarem completamente definidos, pode-se
16 considerar que a sintomatologia primária do TDAH se caracteriza por hiperatividade,
17 impulsividade e déficit de atenção (Taylor, 1998; Himelstein *et al.*, 2000). Os prejuízos
18 atencionais costumam ser bastante importantes e incluem distração exagerada e dificuldade em
19 manter a atenção focada em um determinado assunto ou objeto, o que costumeiramente traz
20 consigo dificuldades de aprendizado e problemas escolares (Sagvolden, 2000; Davids *et al.*,
21 2003). Os indivíduos freqüentemente apresentam outros problemas cognitivos, como dificuldade
22 em planejar tarefas, demora em realizar tarefas intelectuais simples, impetuosidade e
23 esquecimentos freqüentes. Além disso, o TDAH é considerado um dos grandes fatores de risco

1 para a delinquência juvenil, abuso de drogas e distúrbios de personalidade, sendo bastante
2 comum a comorbidade com depressão e ansiedade (Taylor *et al.*, 1998).

3 Existem três subtipos de diagnósticos para o TDAH: o TDAH onde os indivíduos são
4 predominantemente desatentos, distraídos e desorganizados que ocorre mais em meninas do que
5 em meninos; o TDAH predominantemente hiperativo e impulsivo que ocorre mais em meninos
6 do que em meninas; e o subtipo combinado onde os indivíduos apresentam dificuldades
7 atencionais e prejuízos cognitivos e ainda apresentam sintomas de hiperatividade e impulsividade
8 (Taylor *et al.*, 1998).

9 Pouco se sabe sobre a origem neurobiológica deste transtorno psiquiátrico e, até o
10 momento, a hipótese mais provável é de que alterações cerebrais no sistema monoaminérgico
11 estejam envolvidas. Evidências clínicas, por exemplo, demonstram que inibidores da recaptação
12 de catecolaminas, como d-anfetamina ou metilfenidato (Ritalina®), ou inibidores seletivos da
13 recaptação de noradrenalina, como os antidepressivos tricíclicos, provocam uma melhora
14 substancial na qualidade de vida dos portadores de TDAH (Biederman e Spencer, 1999; Seeman
15 e Madras, 1998). Por outro lado, a serotonina não parece ter grande relevância na etiologia do
16 TDAH, visto que o tratamento com inibidores seletivos da recaptação de serotonina promove
17 apenas benefícios limitados nos pacientes com TDAH (Barrickman *et al.*, 1991). Mais
18 especificamente, considera-se que uma hipofunção do sistema dopaminérgico em áreas corticais,
19 límbicas e motoras do cérebro seja a principal responsável pelas alterações comportamentais
20 observadas nos pacientes com TDAH (Sagvolden e Sergeant, 1998). De fato, faz bastante sentido
21 que a dopamina esteja envolvida em uma patologia que congrega sintomas motores e cognitivos,
22 visto que duas das principais vias dopaminérgicas no sistema nervoso central (SNC) estão
23 envolvidas diretamente nestes processos (as vias nigro-estriatal e mesolímbica-cortical,

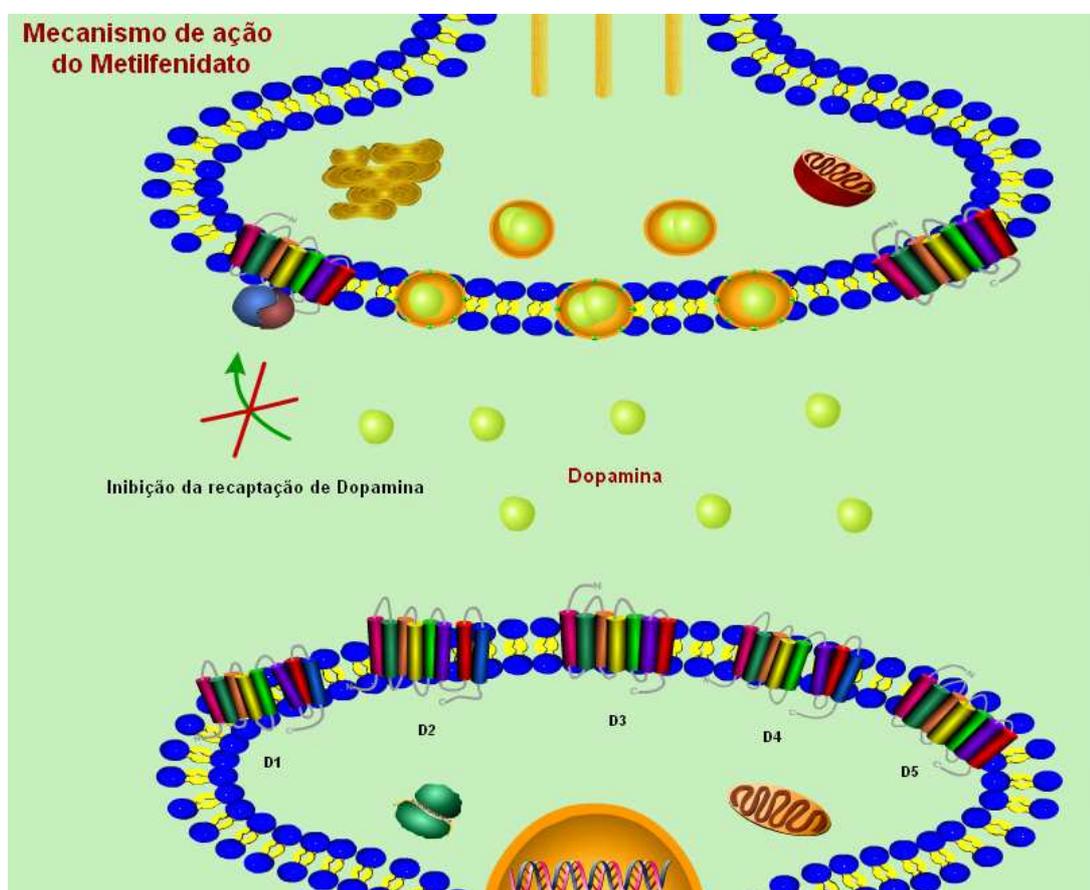
1 respectivamente) (Sagvolden e Sergeant, 1998). Além disso, sugere-se que uma atividade
2 aumentada dos transportadores de dopamina (Krause *et al.*, 2003) ou da monoamino-oxidase
3 (MAO), a enzima responsável pela metabolização da dopamina (Stoff *et al.*, 1989), poderiam
4 contribuir para a hipofunção do sistema dopaminérgico apresentada pelos portadores de TDAH.
5 Como conseqüência provável do hipofuncionamento deste sistema, crianças com sintomas de
6 hiperatividade relacionados ao TDAH apresentam também uma concentração aumentada de
7 receptores dopaminérgicos D₂ no cérebro em relação aos indivíduos sadios de mesma faixa etária
8 (Jucaite *et al.*, 2005).

9 O metilfenidato, comercialmente conhecido como Ritalina ®, é um estimulante utilizado
10 como principal tratamento para o TDAH em crianças e adolescentes (Goldman *et al.*, 1998).
11 Quando utilizado nas doses recomendadas, essa droga possui um elevado índice de segurança, no
12 entanto pouco se sabe sobre a conseqüência do uso crônico desta substância durante a infância e
13 adolescência, idades nas quais está ocorrendo um intenso desenvolvimento e inúmeras
14 modificações neuronais. No entanto, resultados recentes obtidos em roedores demonstraram
15 evidências comportamentais que sugerem prejuízos em funções cerebrais induzidos pelo uso
16 repetido de metilfenidato, e ainda, que essas modificações persistiram por um longo período após
17 o termino do tratamento e após a droga ter sido completamente excretada do organismo (ver
18 LeBlanc-Duchin e Taukulis, 2007).

19 O metilfenidato é um estimulante e seu mecanismo de ação é similar à observada na
20 cocaína e em anfetaminas (Volkow *et al.*, 1995; Solanto, 2000). A conseqüência da exposição a
21 esses estimulantes é o aumento dos níveis sinápticos de dopamina e de noradrenalina em varias
22 regiões do cérebro como hipocampo e córtex pré-frontal (Kuczenski e Segal, 2001). Esse
23 medicamento possui como principal mecanismo de ação a inibição de transportadores de
24 dopamina (DAT) aumentando assim os níveis de dopamina extracelular, modificações ainda

1 podem ser observadas nos receptores dopaminérgicos do subtipo D₂ e também na
2 neurotransmissão dopaminérgica (Gatley *et al.*, 1996; Kuczenski e Segal, 1997; Volkow *et al.*,
3 1998, 1999, 2001; Russell *et al.*, 1998). Adicionalmente o metilfenidato pode afetar os sistemas
4 noradrenérgicos e serotoninérgicos através do bloqueio dos transportadores de noradrenalina e
5 serotonina, no entanto a afinidade por esses transportadores é menor do que pelos transportados
6 de dopamina (Gatley *et al.*, 1996; Kuczenski e Segal, 1997).

7



8

9 **Figura 1** – Representação esquemática do mecanismo de ação do metilfenidato (elaborada por
10 Rial, 2008).

11

12

1 A administração crônica de cocaína ou anfetaminas em animais de laboratório, durante o
2 início da fase de desenvolvimento ou durante a idade adulta, resultaram em modificações
3 funcionais no SNC que trouxeram como consequência déficits cognitivos e modificações
4 comportamentais (ver Robinson e Kolb, 2004). Devido às semelhanças neurofisiológicas entre
5 esses estimulantes e o metilfenidato, imagina-se que o tratamento crônico com essa droga possa
6 afetar vários processos críticos para o aprendizado e processos envolvidos na memória de
7 trabalho. A memória de trabalho está relacionada à integridade funcional do córtex pré-frontal, o
8 qual depende dos níveis sinápticos de dopamina e noradrenalina (Arnsten e Li, 2005). Evidências
9 sugerem que o metilfenidato ajuda na manutenção desses níveis e restaura funções cognitivas de
10 indivíduos que apresentam diminuição nos níveis sinápticos de catecolaminas (Arnsten e Li,
11 2005). No entanto, em indivíduos que apresentam níveis normais de catecolaminas, o uso
12 prolongado de metilfenidato pode induzir perturbações que irão causar adaptações neuronais
13 podendo prejudicar a eficiência das funções cognitivas. Heyser, Pelletier e Febres (2004)
14 encontraram prejuízos na memória de reconhecimento em animais jovens que foram tratados com
15 metilfenidato 5 mg/kg (i.p.) duas vezes ao dia durante 7 dias.

16 O número de prescrições desse medicamento aumentou drasticamente na última década
17 (Olfson *et al.*, 2002), isso tem ocorrido devido a um diagnóstico equivocado, já que comumente
18 crianças que são um pouco mais agitadas são repreendidas e diagnosticadas como portadoras do
19 TDAH. Sendo assim, se torna claro a necessidade de pesquisas clínicas para determinar
20 precisamente a severidade dos sintomas que justifiquem o uso de estimulante como tratamento
21 para esse transtorno, já que esse diagnóstico é realizado cada vez mais cedo, colocando em risco
22 o desenvolvimento cerebral de crianças que estão iniciando esse tratamento antes mesmo dos 2
23 anos de idade (Zito *et al.*, 2000).

24

1.2. RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)

Diversas tentativas têm sido realizadas na expectativa de se desenvolver um modelo animal que represente fielmente as particularidades do TDAH. Isto é, que mimetize as características comportamentais, apresente um perfil similar de resposta aos tratamentos farmacológicos vigentes e apresente características neurobiológicas semelhantes aos portadores deste transtorno. Até o momento, alguns modelos animais foram propostos: ratos selecionados para hiperlocomoção a partir de uma população heterogênea (Puumala *et al.*, 1996), ratos expostos a toxinas ambientais (Silbergeld e Goldberg, 1974; Holene *et al.*, 1998), ratos com lesões neurológicas induzidas por toxinas dopaminérgicas (Shaywitz *et al.*, 1976) e pelo menos três modelos genéticos: Ratos Espontaneamente Hipertensos - SHR (Sagvolden, 2000), ratos Naple com alta e baixa excitabilidade (Sadile *et al.*, 1996) e camundongos deletados geneticamente para o transportador de dopamina (Giros *et al.*, 1996). Cada um destes modelos animais apresenta suas vantagens e desvantagens e, de certa forma, cada um deles é capaz de mimetizar uma ou outra característica do TDAH. No entanto, os ratos da linhagem isogênica SHR têm sido considerados, até o momento, o modelo animal mais completo, e por isso o mais utilizado, no estudo do TDAH (Davids *et al.*, 2003).

A linhagem de ratos SHR foi desenvolvida a partir da seleção de ratos Wistar-Kyoto com fenótipo de hipertensão e, surpreendentemente, os animais apresentavam também índices aumentados de atividade locomotora (Moser *et al.*, 1988). Então, Okamoto e Aoki (1963) utilizando-se da técnica de cruzamentos parentais, criaram a linhagem isogênica SHR, que além de hiperlocomoção, apresentou dificuldades de aquisição em tarefas de memória e respostas excessivas em tarefas de condicionamento operante, refletindo aspectos fundamentais do TDAH, como o déficit de aprendizado, a hiperatividade e a impulsividade, respectivamente (Sagvolden e

1 Sergeant, 1998; Sagvolden, 2000; Russell, 2002). Estes animais apresentam também
2 características neurobiológicas semelhantes ao esperado para os pacientes de TDAH, como uma
3 hipofunção do sistema dopaminérgico, resultante de uma baixa liberação de dopamina (Russel *et*
4 *al.*, 1995) aliada a uma atividade aumentada da MAO, o que diminuiria a disponibilidade deste
5 neurotransmissor na fenda sináptica (Boix *et al.*, 1998).

6 Foram também encontrados níveis aumentados de adenosina nos cérebros de ratos SHR,
7 juntamente a uma baixa atividade da enzima adenosina deaminase, responsável pela
8 metabolização de adenosina, sugerindo uma possível disfunção do sistema adenosinérgico que
9 poderia contribuir para a disfunção primária observada no sistema dopaminérgico (Davies *et al.*,
10 1987). Existem também várias evidências que suportam o papel modulatório da adenosina em
11 processos de aprendizado e memória, podendo ser esse desequilíbrio no sistema adenosinérgico o
12 responsável pelos déficits apresentados por esses animais.

13 Outra importante característica dos ratos SHR é que esses animais apresentam uma
14 relativa diminuição na atividade locomotora e uma melhora nos déficits de aprendizado em
15 resposta ao tratamento com metilfenidato, o que valida farmacologicamente este modelo animal
16 (Ueno *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2002, Adriani *et al.*, 2004). Como consequência, eles têm sido
17 intensamente estudados com o objetivo de se investigar os processos de aprendizado e memória
18 dos portadores de TDAH, visando à possibilidade de desenvolvimento de novas terapias
19 farmacológicas.

20 O déficit de aprendizado apresentado pelos ratos SHR foi demonstrado em diversas
21 tarefas, tais como a esquivas ativa de duas vias (Sutterer *et al.*, 1980), o modelo de
22 reconhecimento social (Prediger *et al.*, 2005a), o labirinto radial (Wyss *et al.*, 1992; Mori *et al.*,
23 1995; Nakamura-Palacios *et al.*, 1996) e o labirinto aquático de Morris (Gattu *et al.*, 1997; Wyss
24 *et al.*, 2000; Terry *et al.*, 2000; De Bruin *et al.*, 2003, Prediger *et al.*, 2005b). Outros estudos têm

1 demonstrado que esses prejuízos cognitivos apresentados pelos ratos SHR podem estar
2 relacionados com a falta de atenção apresentada por esses animais causando assim uma
3 dificuldade de aprendizado (De Bruin *et al.*, 2003; Ferguson e Cada, 2004). No entanto, outros
4 estudos têm criticado o uso de ratos SHR para o estudo do TDAH, já que esses animais não
5 demonstraram apresentar prejuízos cognitivos em algumas das tarefas avaliadas e apresentaram
6 hiperlocomoção, quando comparados a outras linhagens, em apenas algumas idades específicas.
7 Foi possível também observar que os ratos SHR não responderam ao tratamento com
8 metilfenidato, que é a droga mais utilizada para o tratamento do TDAH (van den Bergh *et al.*,
9 2006; Alsop, 2007; Bizot *et al.*, 2007).

10

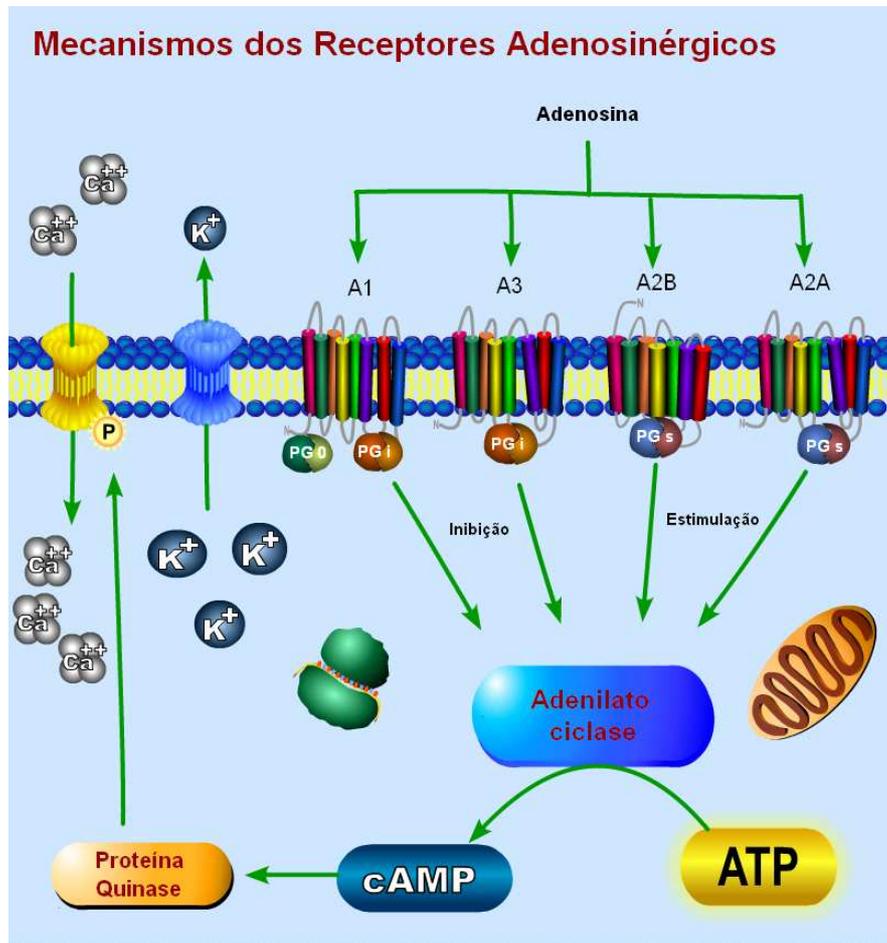
11

12 **1.3. SISTEMA ADENOSINERGICO**

13

14 A adenosina é um neuromodulador, presente em grande quantidade no SNC, que
15 desenvolve um importante papel na regulação da transmissão sináptica e na excitabilidade
16 neuronal (Cunha, 2001). A relevância dos receptores de adenosina foi inicialmente reconhecida
17 através da cafeína, que atua antagonizando de forma não seletiva receptores adenosinérgicos A₁ e
18 A_{2a} (Synder *et al.*, 1981). Até o presente momento, quatro diferentes subtipos de receptores para
19 adenosina (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃) foram clonados e identificados em humanos e roedores, sendo que
20 todos os subtipos são receptores acoplados à proteína G. As ações fisiológicas da adenosina no
21 SNC parecem ser mediadas, principalmente, pelos subtipos A₁ e A_{2A}, que possuem elevada
22 afinidade pela adenosina, além de serem altamente expressos em diversas áreas cerebrais. Os
23 receptores A₁ e A₃ estão acoplados a proteínas G “inibitórias” (Gi ou Go) e os receptores A_{2A} e
24 A_{2B} estão acoplados a proteínas G estimulatória (Gs) (Fredholm *et al.*, 2001; Linden, 2001).

25



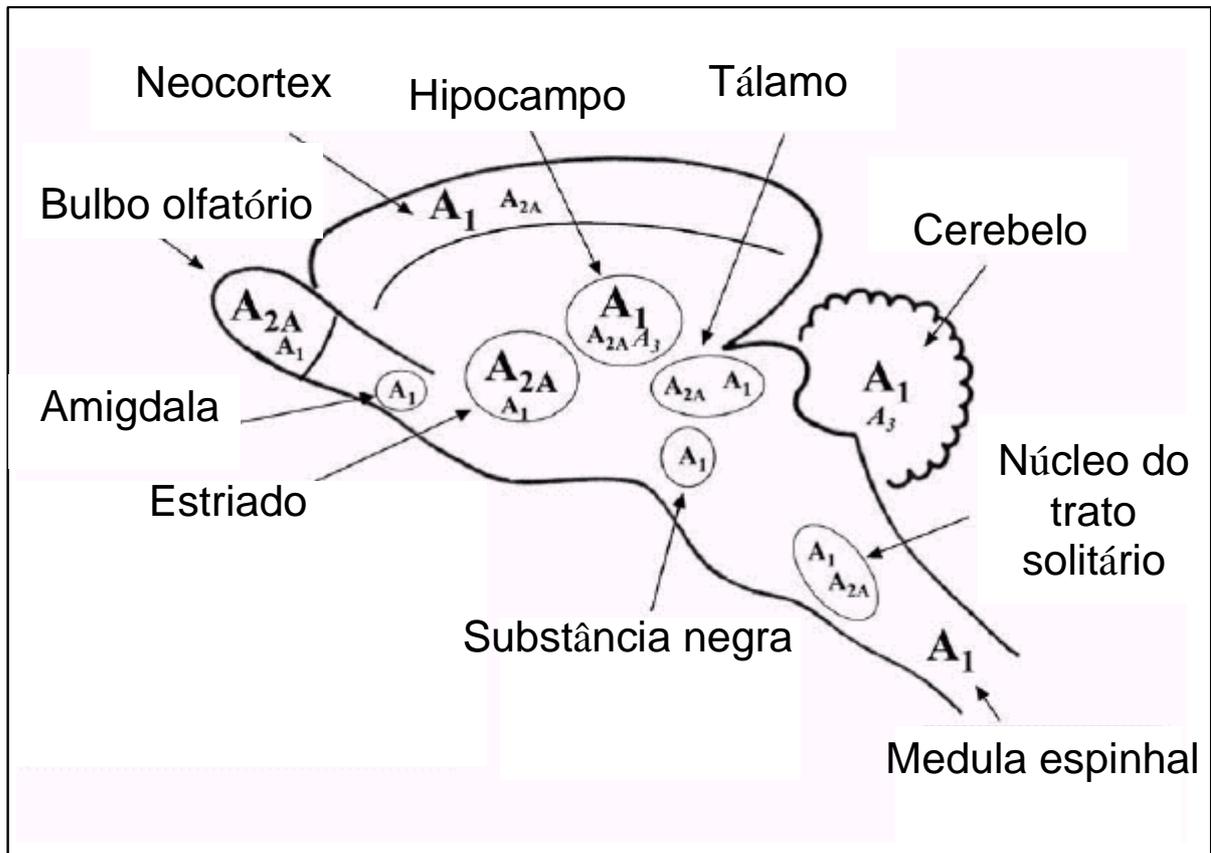
1

2 **Figura 2** - Representação esquemática de receptores adenosinérgicos (elaborado por Rial, 2008).

3

4

5 O receptor adenosinérgico do subtipo A_1 é o mais abundante no SNC, principalmente na
 6 região do neocórtex, cerebelo, hipocampo e corno dorsal da coluna vertebral. Já os receptores
 7 A_{2A} são altamente expressos em neurônios pálido-estriatais e no bulbo olfatório, uma leve
 8 expressão desses receptores também é encontrada em outras regiões cerebrais como, por
 9 exemplo, o hipocampo (Fredholm *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2003).



1

2 **Figura 3** – Representação esquemática da expressão de receptores adenosinérgicos, (adaptado de
 3 Ribeiro *et al.*, 2003).

4

5 Várias evidências suportam o papel modulatório da adenosina em processos de
 6 aprendizado e memória, inclusive mecanismos celulares básicos envolvidos na formação da
 7 memória, como a potencialização de longa duração (LTP) (de Mendonça e Ribeiro, 1994) e
 8 depressão de longa duração (LTD) (de Mendonça *et al.*, 1997). De fato, diversos estudos
 9 demonstram o envolvimento do sistema adenosinérgico na atenção, bem como nos processos de
 10 aprendizado e memória tanto em humanos quanto em animais (Kenemans e Verbaten, 1998), mas
 11 poucos estudos têm relacionado as propriedades farmacológicas de drogas que atuam neste
 12 sistema com o TDAH (Bizarro *et al.*, 2004). Grande parte dos efeitos da cafeína no SNC são
 13 decorrentes da sua interação com os receptores de adenosina presentes no cérebro, atuando como

1 um antagonista não-seletivo destes receptores. A utilização de agonistas de receptores
2 adenosinérgicos A1 (Zarrindast e Shafaghi, 1994), ou possivelmente de ambos os subtipos A1
3 e/ou A2A (Prediger e Takahashi, 2005c), está diretamente relacionada a prejuízos cognitivos,
4 enquanto o antagonismo dos receptores A2A (Prediger *et al.*, 2005a) ou de ambos os receptores
5 A1 e/ou A2A (Prediger e Takahashi, 2005c) é capaz de reverter o desempenho de animais
6 submetidos a tarefas de aprendizado e memória.

7 Evidências sugerem que a maioria dos efeitos psicofarmacológicos da cafeína sejam
8 mimetizados somente pelos antagonistas dos receptores A2A e não pelos antagonistas do subtipo
9 A1, embora a cafeína seja um antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos
10 (Svenningsson *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2005). Estima-se que os efeitos de antagonistas
11 adenosinérgicos estejam intimamente relacionados com a ativação de receptores dopaminérgicos,
12 sugerindo inclusive que a integridade do sistema dopaminérgico seja imprescindível para que a
13 cafeína exerça seus efeitos estimulatórios (Ferré *et al.*, 1992). De fato, há uma grande co-
14 localização entre os receptores adenosinérgicos e dopaminérgicos no SNC, sendo possível a
15 formação de heterodímeros entre os receptores A1/D1 e A2A/D2, levando a alterações alostéricas
16 que afetam a afinidade e o acoplamento à proteína G, modulando a eficácia de ativação de ambos
17 os receptores (Fuxe *et al.*, 1998), interferindo assim em processos de aprendizado e de formação
18 de memória (Franco *et al.*, 2000; Hillion *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2007). Por este motivo,
19 aparentemente, os agonistas dos receptores de adenosina produzem efeitos comportamentais
20 similares aos dos antagonistas da dopamina, enquanto que os efeitos dos antagonistas da
21 adenosina assemelham-se àqueles induzidos por agonistas dopaminérgicos (Fuxe *et al.*, 1998).
22 Além dos efeitos cognitivos, há evidências de que o tratamento repetido com drogas
23 psicoestimulantes, como a cafeína, poderia diminuir a atividade locomotora exagerada
24 apresentada pelos ratos SHR, possivelmente também envolvendo uma interação com o sistema

1 dopaminérgico (Wultz *et al.*, 1990). Portanto, levando-se em consideração as evidências acima
2 expostas, parece bastante factível que a manipulação do sistema adenosinérgico possa resultar em
3 uma intervenção farmacológica no TDAH para ambas as características de déficit de atenção e de
4 hiperatividade observadas neste distúrbio comportamental.

5 A cafeína pertence ao grupo dos compostos químicos chamados de metilxantinas, ela é a
6 substância psicoativa mundialmente mais consumida, seu grande consumo ocorre principalmente
7 pelo fato de que ela é um constituinte químico importante de várias bebidas alimentícias ou
8 estimulantes não alcoólicas e está presente em vários alimentos utilizados diariamente na
9 alimentação mundial, como no café, chás, chocolates e em refrigerantes a base de guaraná ou
10 cola, seja como preparações caseiras ou produtos industrializados, com grande importância
11 econômica e cultural. A cafeína é obtida de fontes vegetais, principalmente do café.

12 Bebidas contendo metilxantinas são consumidas desde tempos remotos, datando
13 provavelmente da era paleolítica. A mais antiga delas parece ser o chá-da-índia, cuja primeira
14 menção documentada de uso é atribuída ao imperador chinês Shen Nung, em 2737 a.C. O
15 primeiro relato escrito do uso do café data do século X, utilizado como bebida quente na Arábia,
16 por volta de 1000 d.C. Porém, este vegetal é cultivado na Etiópia desde 575 d.C., onde foi
17 inicialmente utilizado triturado com gordura, como alimento e a partir da fermentação dos frutos,
18 como vinho. O cacau também tem uma longa história. Uma bebida doce, considerada um
19 presente dos deuses e obtida a partir da fermentação, denominada chocolate, foi oferecida pelo
20 imperador asteca Montezuma aos conquistadores espanhóis em 1519. Esta bebida foi introduzida
21 na Europa, onde se popularizou e, em 1876, passou a ser produzida com leite, na Suíça, de onde
22 se originaram as mais variadas formas, consumidas e apreciadas mundialmente (Roberts e
23 Barone, 1983; Stefanovich, 1989).

1 A farmacocinética da cafeína depende de vários fatores como idade, peso, tabagismo,
2 regime alimentar, insuficiência hepática e outras condições patológicas. A cafeína é absorvida
3 facilmente por via oral, sendo que 99 % da absorção ocorre no trato gastrintestinal e os picos
4 plasmáticos são obtidos em 15 a 45 minutos. Ela possui metabolização hepática sendo que o
5 principal metabólito da cafeína no homem é a parametilxantina (70%), a excreção é urinária e o
6 tempo de meia-vida da cafeína está entre 5 e 6 horas (Borstel, 1983; Sawynok, 1995).

7 A cafeína possui vários alvos farmacológicos, como a inibição da fosfodiesterase e o
8 bloqueio de receptores GABA_A (Fredholm et al., 1999), no entanto seu principal alvo é o
9 antagonismo da ação da adenosina, um neuromodulador presente em grande quantidade no SNC,
10 que ocorre através do impedimento da ligação de adenosina em seus receptores metabotrópicos
11 A₁ e A_{2A} de forma não seletiva (Snyder et al., 1981).

12 Esta substância é conhecida pela sua capacidade de melhorar a atenção e a memória
13 (Fredholm et al., 1999), efeitos esses que estão sendo estudados e demonstrados em diferentes
14 laboratórios. Estudos pré-clínicos em roedores demonstram o potencial da cafeína na melhora de
15 prejuízos cognitivos relacionados a dificuldades de aprendizado e déficits de memória (Takahashi
16 et al., 2008), como os recentemente executados em nosso laboratório onde a cafeína foi capaz de
17 reverter o prejuízo na performance de ratos SHR em tarefas de memória espacial no labirinto
18 aquático de Morris e na tarefa de memória social (Prediger et al., 2005a, b). Já em humanos,
19 estudos sobre possíveis efeitos do consumo de cafeína, em processos cognitivos, ainda são
20 contraditórios já que não se demonstram claras evidências da melhora dos indivíduos quando
21 submetidos a testes cognitivos (Hameleers et al., 2000; Smit e Rogers, 2000; Rogers et al., 2003;
22 van Boxtel et al., 2003; Haskell et al., 2005).

23
24
25

1 **1.4. RECONHECIMENTO DO OBJETO**

2

3 A tarefa de reconhecimento do objeto, originalmente proposto por Ennaceur e Delacour

4 (1988), é uma ferramenta experimental de bastante utilidade. O protocolo fundamental deste

5 modelo é bastante simples e utiliza basicamente um campo aberto e pelo menos dois modelos

6 diferentes de objetos, que serão apresentados aos animais. Primeiramente os animais precisam ser

7 habituados ao campo aberto, de modo a se familiarizarem ao aparelho, o que aguça a curiosidade

8 dos animais pelos objetos que posteriormente serão adicionados ao ambiente (Besheer e Bevins,

9 2000). Após esta etapa, dois objetos idênticos são adicionados ao campo aberto e se observa o

10 tempo que o animal permanece investigando cada um dos objetos (fase de apresentação dos

11 objetos). Depois de um intervalo de tempo variável (dependendo da intenção em se avaliar

12 memória de curta ou longa duração), substitui-se um dos objetos e avalia-se novamente o tempo

13 que o animal permanece investigando cada um dos objetos (fase de reconhecimento dos objetos).

14 Nesta etapa, a tendência natural é que o animal reconheça o objeto exposto na primeira etapa e

15 investigue o objeto novo por um maior período de tempo em relação ao objeto familiar. A

16 popularidade desde modelo tem aumentado já que o animal não precisa ser exposto a estímulos

17 aversivos, restrição de água ou de alimentos, o procedimento não necessita de varias sessões de

18 treino e ainda pode ser facilmente replicado em diversos laboratórios tanto para ratos como para

19 camundongos (Bevins e Besheer, 2006). Embora de simples execução, este modelo experimental

20 envolve aspectos de locomoção, atenção, aprendizado e memória, que podem torná-lo um modelo

21 bastante útil para avaliação de drogas com potencial para o tratamento do TDAH.

22 Além da possibilidade de se avaliar possíveis efeitos de drogas sobre o comportamento

23 exploratório durante as sessões de habituação, pode-se observar efeitos de drogas sobre a

24 aquisição de informações durante a fase de apresentação dos objetos e sobre a capacidade visual

1 discriminatória durante a fase de reconhecimento dos mesmos. Ambas as tarefas são processos
2 mnemônicos nos quais a atenção possui uma importância fundamental (Norman e Eacott, 2004).

3 No desenvolvimento do presente estudo, utilizaremos uma versão modificada do modelo
4 de reconhecimento do objeto, sugerida recentemente por Norman e Eacott (2004), que intensifica
5 a dificuldade da tarefa e aumenta ainda mais a sua utilidade como modelo de atenção. A principal
6 diferença da modificação proposta por estes autores é que na fase de reconhecimento dos objetos,
7 ao invés de se utilizar apenas uma opção de objeto novo, os animais são expostos a objetos com
8 diferentes níveis de complexidade estrutural, comparados ao objeto familiar. Desta forma, uma
9 maior capacidade discriminatória é requerida aos animais, havendo necessidade de maior atenção
10 na fase de reconhecimento dos objetos para que o animal perceba as diferenças sutis entre o
11 objeto familiar e o novo. Sendo assim será possível avaliar a capacidade discriminatória das
12 linhagens utilizadas e investigar a participação do sistema adenosinérgico nos resultados
13 encontrados, com a expectativa de caracterizar a participação do mesmo como um possível alvo
14 farmacológico para o tratamento dos prejuízos cognitivos característicos do TDAH.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

2. OBJETIVOS

Considerando os fatos relatados na introdução, o objetivo do presente estudo foi comparar a performance dos ratos WIS e SHR na tarefa de reconhecimento de objetos, e investigar a participação do sistema adenosinérgico nos prejuízos cognitivos encontrados na linhagem SHR.

Para tanto, as seguintes etapas serão realizadas:

- Caracterizar o prejuízo atencional dos ratos SHR em comparação ao desempenho dos ratos WIS na versão modificada do modelo de reconhecimento do objeto;
- Investigar o envolvimento do sistema adenosinérgico no prejuízo cognitivo apresentado pelos ratos SHR através da administração de cafeína;
- Comparar os efeitos do tratamento com cafeína ao metilfenidato, principal terapia farmacológica utilizada para o TDAH;
- Identificar em qual subtipo de receptores adenosinérgicos ocorre a ação da cafeína, através da administração de antagonistas seletivos para receptores A_1 ou A_{2A} ;
- Investigar o efeito do tratamento agudo com cafeína, metilfenidato e antagonistas seletivos de receptores adenosinérgicos sobre a pressão arterial, a fim de descartar o papel da pressão arterial nos resultados encontrados;

- 1 • Avaliar os efeitos do tratamento repetido com cafeína ou metilfenidato em ratos WIS e
2 SHR adultos na tarefa de reconhecimento de objetos, locomoção, pressão arterial e ganho
3 de peso corporal;
4
- 5 • Avaliar a persistência do efeito do tratamento repetido com cafeína ou metilfenidato em
6 ratos WIS e SHR durante a adolescência na tarefa de reconhecimento de objetos,
7 locomoção, pressão arterial e ganho de peso corporal na idade adulta;
8
- 9 • Investigar possíveis diferenças na expressão de receptores adenosinérgicos A1 e A2A no
10 córtex parietal e hipocampo entre as linhagens WIS e SHR através da técnica de imuno-
11 histoquímica.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos machos e fêmeas, adolescentes e adultos, das linhagens SHR e Wistar foram utilizados para os procedimentos experimentais. A adolescência foi definida entre período pós-natal (PN) 20 e 34 dias, idade correspondente a pré-adolescência em humanos (Andersen *et al.*, 2001), já a idade adulta foi definida pelo período entre PN 75 e PN 90.

A colônia de ratos SHR utilizada neste estudo é 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). A linhagem SHR foi considerada como isogênica uma vez que os animais apresentaram uma alta homologia de DNA entre seus indivíduos (Ramos *et al.*, 1997). Para realização deste estudo as colônias de ratos SHR foram criadas e mantidas em nosso laboratório.

Embora a linhagem Wistar Kyoto possua um background genético semelhante aos do SHR, o que faz dela a melhor linhagem para comparações que visam buscar explicações sobre fenômenos dos ratos SHR, especialmente em estudos de hipertensão, traço para o qual a linhagem SHR foi desenvolvida a partir da WKY (Okamoto e Aoki, 1963), não a utilizamos como linhagem controle, já que nosso estudo investiga a participação do sistema adenosinérgico nos prejuízos cognitivos dos ratos SHR, e alguns estudos demonstram que a linhagem WKY também possui prejuízos em relação às linhagens heterogênicas mais comuns (Grauer e Kapon,

1 1993; De Bruin *et al.*, 2003; Clements e Wainwright, 2006). Por esse motivo, e após validação
2 das habilidades cognitivas da linhagem WIS em vários modelos experimentais utilizados
3 anteriormente em nosso laboratório, resolvemos utilizar a linhagem de ratos WIS como controle,
4 refletindo uma população geneticamente heterogênea.

5 Sendo assim a colônia de ratos Wistar é originária da EPM/UNIFESP (São Paulo, SP,
6 Brasil), sendo criadas e mantida no biotério central da UFSC (Florianópolis, SC, Brasil) desde
7 1991. Para a realização deste estudo as colônias de ratos Wistar, considerados uma população
8 heterogênea, foram obtidas do biotério central da UFSC.

9 Os animais foram desmamados e separados por sexo com quatro semanas de idade, é após
10 isso, foram agrupados em cinco ou seis em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm), e mantidos em
11 ambiente com temperatura controlada (23 ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (fase clara
12 7:00-19:00). Alimento e água foram disponibilizados *ad libitum*. O estágio do ciclo estral das
13 fêmeas WIS e SHR não foi analisado nos experimentos realizados, já que se pretendeu avaliar o
14 comportamento de uma população heterogênea. Todos os procedimentos experimentais foram
15 realizados entre as 09:00 e 17:00 horas e ocorreram de acordo com as normas de conduta com
16 animais experimentais do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de
17 Santa Catarina (CEUA-UFSC).

18
19

20 **3.2. Drogas**

21

22 As drogas utilizadas foram metilfenidato (Ritalin ®, Norvartis, Brasil) na dose de 2 mg/kg
23 e o antagonista de receptores adenosinérgico não seletivo cafeína (Sigma., USA) nas doses de 1,
24 3 e 10 mg/kg que foram dissolvidas em 0,9 % de NaCl (salina). Também foram utilizados os

1 antagonistas adenosinérgicos seletivos para receptores A1 ciclopentil-1,3-dipropilxantina
2 (DPCPX) nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg e o antagonista adenosinérgico seletivo para receptores
3 A2A 4-(2-[7-amino-2-{2-furil}{1,2,4}triazolo-{2,3-a}{1,3,5} triazin-5-il-amino]etil)fenol
4 (ZM241385) nas doses de 0,5 e 1 mg/kg (Tocris Cookson, USA) que foram dissolvidos em salina
5 com 10 % de dimetilsulfoxido (DMSO). A solução controle consistiu do veículo utilizado para
6 dissolver as drogas. Todas as doses foram selecionadas a partir de experimentos pilotos ou de
7 estudos prévios (Prediger *et al.*, 2005a,b, Andersen *et al.*, 2001).

8 As drogas foram administradas intraperitonealmente (i.p.) no volume de 1ml/kg de peso
9 corporal para os animais tratados na idade adulta e no volume de 5 ml/kg de peso corporal para
10 os animais tratados na adolescência. A administração ocorreu trinta minutos antes da fase de
11 apresentação aos objetos, no tratamento agudo e uma vez ao dia, durante 14 dias no tratamento
12 repetido. O tratamento teve início no 20º dia PN para os animais tratados na adolescência.

13

14

15 **3.3. Procedimentos experimentais**

16

17 **3.3.1. Reconhecimento de objetos**

18

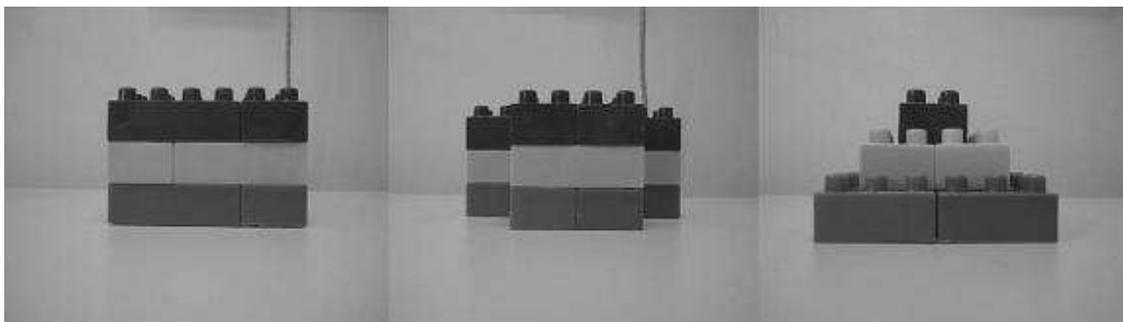
19 **Campo aberto**

20 O campo aberto (CA) para ratos consiste em uma arena feita de madeira com 100x100
21 cm de base, pintada de branca e dividida por linhas pretas formando 25 quadrados de 20x20 cm.
22 A base é cercada por paredes brancas de madeira com 40cm de altura. A luminosidade do
23 ambiente foi mantida em cerca de 10 Lux. Após o final de sessão de análise comportamental o
24 campo aberto foi limpo com álcool 10 % e papel toalha.

1 **Objetos**

2 Três cubos, um "T" e uma pirâmide ("P") feitos de blocos plásticos desmontáveis,
3 medindo 10 X 10 cm, foram utilizados na tarefa de reconhecimento do objeto (ver Figura 1). A
4 fim de se verificar a influência do nível de ambigüidade entre os objetos na capacidade de
5 reconhecimentos dos mesmos, graus crescente de complexidade estrutural foram utilizados no
6 presente estudo. Os objetos A1, A2 e A3 foram representados pelos cubos e os objetos B
7 representados por um dos outros dois objetos disponíveis (pirâmide ou "T").

8



9

10

11 **Figura 4** - Vista lateral dos três objetos que foram utilizados no modelo de reconhecimento do
12 objeto.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

1 **Teste do reconhecimento do objeto**

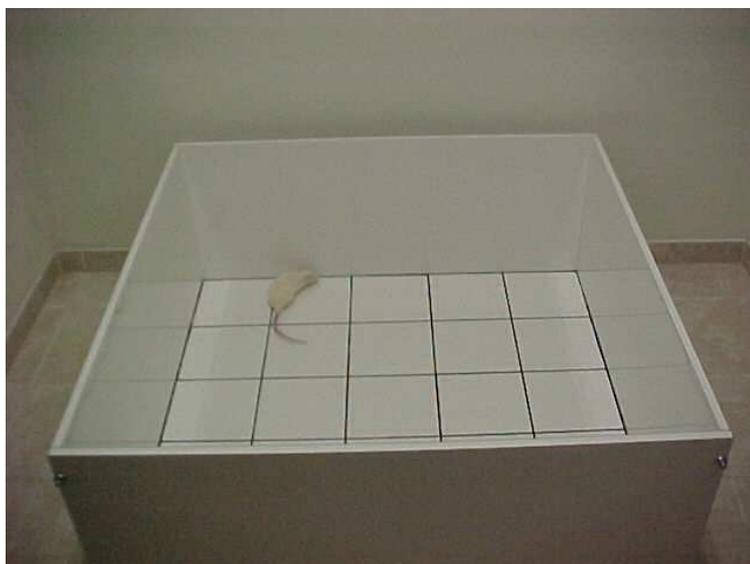
2 O teste do reconhecimento do objeto foi adaptado de um procedimento experimental
3 previamente descrito (Norman e Eacott, 2004; Abe *et al*, 2004) e consistiu de três fases:

4

5 **Fase de habituação (Dias 1 e 2):** Em dois dias consecutivos, os animais foram expostos ao
6 campo aberto e o exploraram livremente por 10 min. Essa fase é realizada com o objetivo de
7 familiarização dos animais no aparelho, para que no dia do teste a exploração de um ambiente
8 novo não interfira na investigação dos objetos. Depois deste período os animais foram colocados
9 novamente em suas respectivas gaiolas e retornaram ao biotério.

10

11



12

13 **Figura 5** – Representação da fase de habituação (campo aberto).
14
15
16
17
18
19

1 **Fase de apresentação dos objetos (Dia 3):** Nesta fase os animais foram apresentados por 3 min
2 a dois objetos idênticos (nomeados de A1 e A2) colocados em duas extremidades opostas do
3 campo aberto. Cada objeto foi posicionado a cerca de 20 cm das paredes do aparelho e a 60 cm
4 do outro objeto. Após a fase de apresentação dos objetos, os animais foram retirados do campo
5 aberto e mantidos em suas respectivas gaiolas.

6

7



8

9

10 **Figura 6** – Representação da fase de apresentação aos objetos

11

12

13

14

15

16

17

18

1 **Fase de reconhecimento dos objetos (Dias 3):** Trinta minutos após a fase de apresentação dos
2 objetos os animais foram re-expostos ao campo aberto por 3 min para avaliação de memória de
3 curta duração. Nesta fase, um objeto idêntico aos anteriores (nomeado de A3) e um objeto novo
4 (nomeado de B) foram colocados nas posições antes ocupadas pelos objetos A1 e A2. O
5 posicionamento dos objetos foi balanceado entre as sessões. O tempo de investigação (s),
6 definido como o tempo em que o animal permanece com o focinho posicionado em direção ao
7 objeto a uma distância igual ou inferior a 2 cm ou tocando o objeto, foi registrado e utilizado
8 como índice de memória (Norman e Eacott, 2004; Abe *et al.*, 2004). Além do tempo de
9 investigação, a razão de discriminação foi utilizada como índice da capacidade de
10 reconhecimento dos objetos diferentes (A e B) e foi calculada dividindo-se a diferença do tempo
11 de exploração entre o objeto novo e o conhecido pelo tempo total de exploração na fase de
12 reconhecimento dos objetos $(B - A3)/(B+A3)$.

13



14

15

16

17

Figura 7 – Representação da fase de reconhecimento dos objetos

1 **3.3.2. Locomoção**

2
3 Durante a fase de apresentação aos objetos e/ou durante a fase de discriminação dos
4 mesmos foi analisado a atividade locomotora dos animais. Este procedimento foi realizado para
5 avaliar tanto a diferença na atividade locomotora relacionada às diferentes linhagens utilizadas
6 (WIS e SHR) quanto para avaliar o efeito das drogas utilizadas na locomoção desses animais. A
7 locomoção foi analisada por 3 min onde o número de cruzamentos horizontais totais dos animais
8 no campo aberto foram registrados através de contadores manuais. O cruzamento foi considerado
9 quando os animais cruzavam a linha com as quatro patas.

11 **3.3.3. Peso Corporal**

12
13 O peso corporal dos animais WIS e SHR foi medido de dois em dois dias durante o
14 tratamento repetido (14 dias) com solução veiculo, cafeína ou metilfenidato, tanto durante a
15 adolescência quanto na idade adulta. Esse procedimento foi realizado para verificar o efeito das
16 drogas utilizadas na ingestão de alimentos e na manutenção do peso corporal.

18 **3.3.4. Pressão arterial**

19
20 A pressão arterial (mmHg) de ratos fêmeas adultos WIS e SHR foi medida após o
21 tratamento agudo com: solução veiculo (salina ou salina com DMSO 10 %), metilfenidato
22 (2mg/kg), cafeína (1, 3 ou 10 mg/kg), DPCPX (1, 3 ou 5 mg/kg), ZM241385 (0,5 ou 1 mg/kg) ou
23 MIX (3 mg/kg de DPCPX e 0,5 mg/kg de ZM241385) e também após o tratamento repetido com
24 veiculo, metilfenidato (2mg/kg) ou cafeína (3 mg/kg) durante a adolescência ou durante a idade
25 adulta. Para realização desta medida os animais foram anestesiados com uma mistura contendo

1 cetamina (90 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), injetada pela via intramuscular. Uma vez
2 anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica
3 aquecida (temperatura entre 35 e 36° C). Para prevenir a formação de coágulos e a obstrução das
4 cânulas os animais receberam uma injeção intraperitoneal de heparina (300 UI) 10 minutos antes
5 da anestesia. Para facilitar a respiração espontânea, todos os animais foram submetidos a
6 traqueostomia. Na seqüência, a artéria carótida esquerda foi localizada e, de forma cuidadosa e
7 rápida, separada do nervo vago e tecidos adjacentes. O fluxo sanguíneo da artéria carótida foi
8 interrompido na extremidade distal através da ligadura com fio de sutura, enquanto o fluxo da
9 extremidade proximal foi temporariamente suprimido por compressão com uma pinça curva. Um
10 pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo
11 como via de inserção de um catéter de polietileno (Angiocath[®], número 19), devidamente
12 heparinizado, o qual foi firmemente amarrado na artéria e conectado ao transdutor de pressão
13 (Mikro-Tip[®], Millar Instruments, Inc., Houston, Texas, USA) acoplado a um sistema de
14 aquisição Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Após um período de
15 estabilização de 30 minutos os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica e diastólica (em
16 mmHg) e da frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm) foram registrados. Ao término
17 dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através da administração intravenosa de
18 altas doses de xilocaína.

19

20 **3.3.5. Reação de Imuno-histoquímica**

21

22

23

24

25

Após o termino dos testes comportamentais, ratos adultos WIS e SHR foram perfundidos
transcardicamente com solução PBS contendo 4% de paraformaldeido (w/v). Os cérebros foram
cuidadosamente removidos e mantidos na mesma solução de paraformaldeido por 24 horas, após

1 esse tempo os cérebros foram mantidos em álcool 70% até o momento da confecção dos blocos
2 de parafina.

3 A expressão dos receptores de adenosina A1 e A2A foram detectados em cortes
4 histológicos confeccionados a partir dos blocos de parafina contendo amostras dos cérebros dos
5 ratos WIS e SHR utilizados no estudo. Os cortes teciduais de espessura de 3 µm foram montados
6 sobre lâminas preparadas com solução de ATPS a 5% (3-aminopropyltriethoxysilene; SIGMA
7 CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA) em acetona PA, sendo mantidas em estufa a uma
8 temperatura de 50°C durante 1h para fixação dos cortes nas lâminas.

9 Após fixação, os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados por passagens
10 sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, etanol 80% e
11 finalmente etanol 70%). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o
12 objetivo de eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as
13 lâminas foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% e metanol absoluto
14 (V/V), em uma passagem de 20 min, com posterior lavagem através de duas passagens em água
15 destilada.

16 Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao
17 tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos
18 mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi preparada
19 uma solução composta por 180 mL de ácido cítrico 0,1M (MERCK, São Paulo/SP, Brasil) e 820
20 mL de citrato de sódio 0,1M (MERCK, São Paulo/SP, Brasil) pH 6,0. Após preparo da solução,
21 as lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada, e
22 mantidas em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 min.

23 Logo após, ainda como parte do processo de reativação antigênica através do calor, as
24 lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente, e

1 posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas
2 em tampão salina fosfato (PBS, composição: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM,
3 pH 7,2-7,4) (SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, MO, USA).

4 O anticorpo monoclonal primário anti-A1 (Sigma®, Saint Louis, USA) foi diluído a 1:100
5 já o anticorpo monoclonal primário anti-A2A (Santa Cruz Biotechnology) foi diluído a 1:200,
6 em uma solução comercial apropriada à diluição de anticorpos (Dako Cytomation®, Carpinteria,
7 CA, USA), composta por TRIS-NaCl (Tris Base 13,9g, Tris-HCl 60,6g, NaCl 87,66g, pH 7,6) e
8 um reagente comercial bloqueador de reação inespecífica.

9 Após esta etapa, a solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais
10 e as lâminas foram mantidas em câmara úmida, de 2-8°C durante 12h. A seguir, estas foram
11 lavadas com tampão PBS, por 2 vezes, por 5 min cada, à temperatura ambiente. Após lavagem as
12 lâminas foram incubadas com anticorpo secundário Envision plus (Dako Cytomation®,
13 Carpinteria, CA, USA) conjugado com um polímero de peroxidase (EN VISION PLUS, Dako
14 Cytomation, Carpinteria, CA, USA) pronto para uso em câmara úmida durante 1h à temperatura
15 ambiente.

16 Posteriormente, foram realizadas duas lavagens utilizando-se PBS por 5 min, à temperatura
17 ambiente. As amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com uma solução
18 cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-
19 tetraaminobiphenyltetrahydrochloride) (DAB), diluído em tampão imidazol pH 7,2 e peróxido de
20 hidrogênio a 0,3%. Após a revelação, foram realizadas a contra coloração das lâminas com
21 solução de Hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em
22 concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, etanol 80%, 90% e etanol absoluto),
23 diafanização em xilol e montagem em ENTELLAN® (MERCK, São Paulo/SP, Brasil).

1 O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da
2 marcação pelos anticorpos. A leitura das lâminas e digitalização das imagens de todas as sub-
3 regiões hipocâmpais (CA1, CA2, CA3 e giro denteado), córtex e estriado foram realizadas em
4 microscópio óptico comum (NIKON, 80i) acoplado a câmera digital (Digital Sight Câmera, DS-
5 5M-L1; Nikon, Nova Iorque, USA). Para quantificação da expressão dos receptores
6 adenosinergicos nas diferentes regiões as imagens obtidas em aumento de 20X foram analisadas
7 através de um software de análise de imagens (CHPTool Cyclops, Brasil).
8 A quantificação dos receptores foi expressa por porcentagem de área marcada em relação a área
9 total analisada.

10

11 **3.4. Análise estatística**

12

13 Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), sendo
14 que n é igual ao número de ratos utilizados em cada grupo experimental. A análise estatística foi
15 realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de duas vias, com o fator linhagem, objeto e
16 tratamento como variáveis independentes ou através da (ANOVA) de três vias, sendo o fator
17 linhagem, tratamento e repetição as variáveis independentes. O teste post-hoc de Duncan foi
18 utilizado para comparações adicionais, em decorrência de valores significantes de $P \leq 0.05$ para a
19 ANOVA. O teste “t” de Student foi também utilizado para comparações diretas. O nível de
20 significância para todos os testes foi de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas
21 utilizando o pacote estatístico Statistica® 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

22

23

24

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

Resultados Tratamiento Agudo

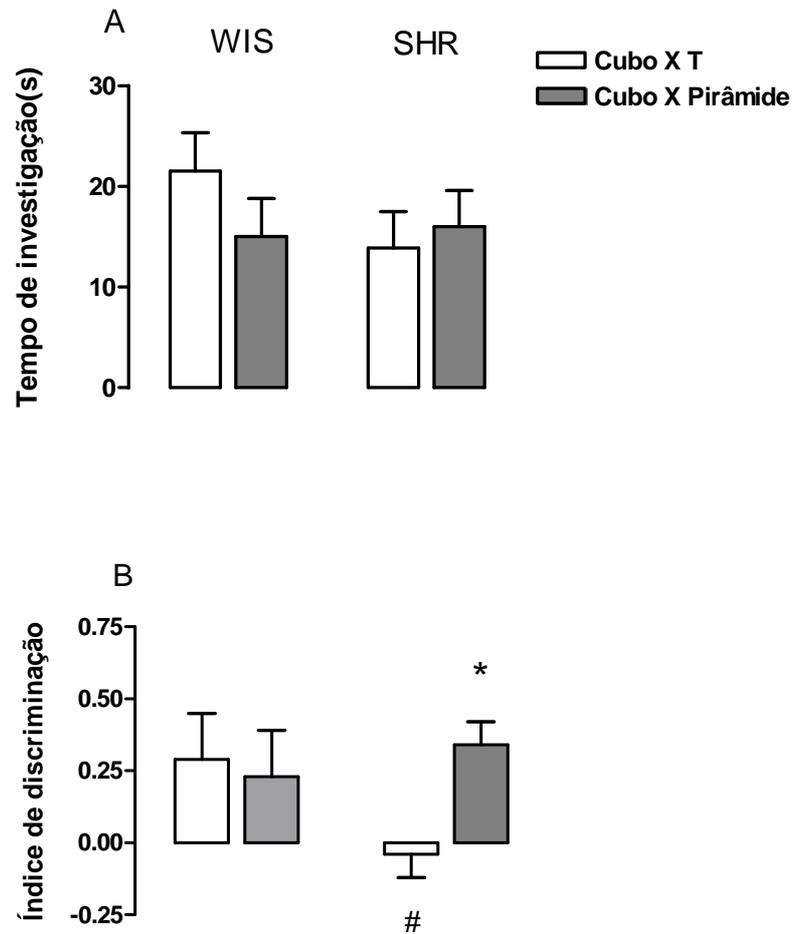
1 4. RESULTADOS

4 4.1. Comparação entre as linhagens WIS e SHR no teste do reconhecimento de objetos

6 Inicialmente, para avaliar o desempenho dos ratos WIS e SHR machos e fêmeas no teste
7 de reconhecimento de objetos, grupos independentes de ambas as linhagens foram designados
8 para um dos dois grupos experimentais, nomeados de acordo com o par de objetos utilizados:
9 cubo X “T” ou cubo X pirâmide.

10 Os resultados do desempenho dos ratos WIS e SHR machos no tempo de investigação,
11 durante a etapa de apresentação aos objetos e do índice de reconhecimento, durante a fase de
12 reconhecimento estão ilustrados nas figuras 8A e 8B. Ao analisar o tempo de investigação dos
13 objetos, a análise de variância realizada através da ANOVA de duas vias (fator linhagem X
14 objeto) não revelou efeito significativo para os fatores linhagem [$F(1,30)=0.83, P=0.37$], objetos
15 [$F(1,30)=0.36, P=0.55$] e para a interação entre esses fatores [$F(1,30)=1.40, P=0.25$]. Quando
16 avaliado o índice de reconhecimento, não foi encontrado efeito significativo para os fatores
17 linhagem [$F(1,30)=1.46, P=0.24$] e objeto [$F(1,30)=2.44, P=0.13$], já para a interação entre os
18 dois fatores a ANOVA revelou efeito significativo [$F(1,30)=4.33, P\leq 0.05$]. Subseqüente teste
19 de Duncan indicou que os ratos SHR apresentam prejuízo no índice de reconhecimento quando
20 expostos ao objeto “T” durante a fase de reconhecimento dos objetos, comparado ao índice de
21 reconhecimento dos ratos WIS expostos ao mesmo objeto e também quando comparado ao grupo
22 exposto ao objeto “P” da mesma linhagem na mesma fase ($p<0.05$). Já os ratos WIS foram
23 capazes de discriminar ambos os objetos investigando assim por mais tempo o novo objeto (“T”
24 ou pirâmide).

Machos - adultos



1

2 **Figura 8** – Comparação entre ratos machos WIS e SHR adultos no teste de reconhecimento de
3 objetos. Após a fase de habituação no campo aberto, os animais foram expostos a 2 cubos
4 idênticos (A1 e A2) na fase de apresentação aos objetos e 30 min depois eles foram expostos a
5 outro cubo igual aos anteriores (A3) e a um objeto não familiar (B) na fase de reconhecimento
6 dos objetos. Os objetos B utilizados foram a pirâmide (P) e o objeto na forma de “T”. (A) O
7 tempo de investigação (s) foi calculado através da soma do tempo de investigação dos objetos A1
8 e A2 durante a fase de apresentação aos objetos. (B) Já o índice de discriminação foi calculado
9 pelo tempo que os animais investigaram $(B-A3)/(B+A3)$. Os valores foram expressos como
10 média \pm erro padrão da média (E.P.M.), # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo “T” WIS. * $p < 0.05$
11 quando comparado ao grupo “T” SHR (teste de Duncan). (n = 8-9).

12

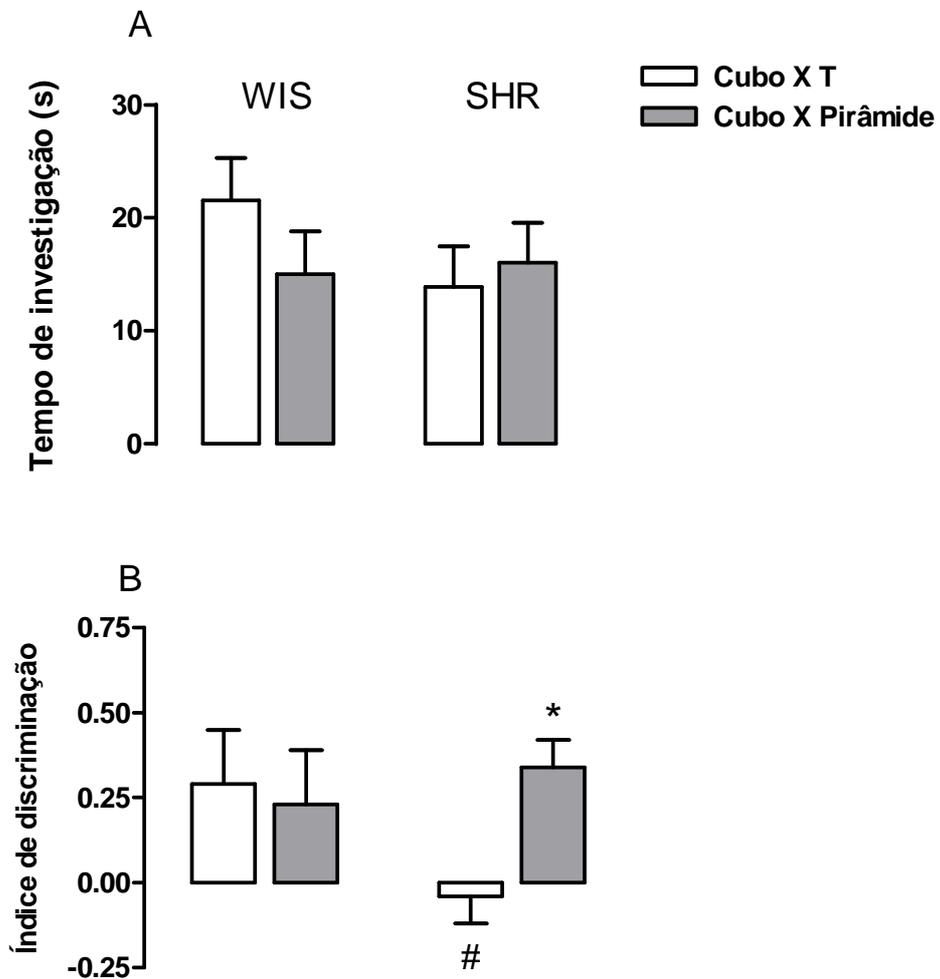
13

14

1
2
3 Após verificação do desempenho de ratos machos das linhagens WIS e SHR no modelo
4 apresentado, analisamos a performance de ratos fêmeas, das mesmas linhagens, para verificar se
5 existe diferenças entre sexo (figuras 9Ae 9B). Ao analisar o tempo de investigação dos objetos, a
6 análise de variância realizada através da ANOVA de duas vias (fator linhagem X objeto) não
7 revelou efeito significativo para os fatores linhagem [$F(1,22)=0.01$, $P=0.92$], objeto
8 [$F(1,22)=0.92$, $P=0.35$] ou para a interação entre os fatores linhagem e objeto [$F(1,22)=0.71$,
9 $P=0.41$]. Quando avaliado o índice de reconhecimento, a ANOVA de duas vias revelou efeito
10 significativo para os fatores linhagem [$F(1,22)=5.50$, $P\leq 0.05$], objeto [$F(1,22)=10.0$, $P\leq 0.01$] e
11 para a interação entre os dois fatores [$F(1,22)=5.50$, $P\leq 0.05$]. Subseqüente teste de Duncan
12 indicou que os ratos SHR apresentam prejuízo no índice de reconhecimento quando expostos ao
13 objeto “T” durante a fase de reconhecimento dos objetos quando comparado ao índice de
14 reconhecimento dos ratos WIS e também quando comparado ao grupo exposto ao objeto “P” da
15 mesma linhagem na mesma fase ($p<0.05$). Já os ratos WIS foram capazes de discriminar ambos
16 os objetos investigando assim por mais tempo o novo objeto (“T” ou pirâmide).

17 Após caracterizar o prejuízo dos ratos SHR, na habilidade de discriminar o objeto “T”, em
18 todos os próximos experimentos realizados o cubo foi utilizado como objeto familiar e o “T”
19 como novo objeto.

Fêmeas - adultas



1

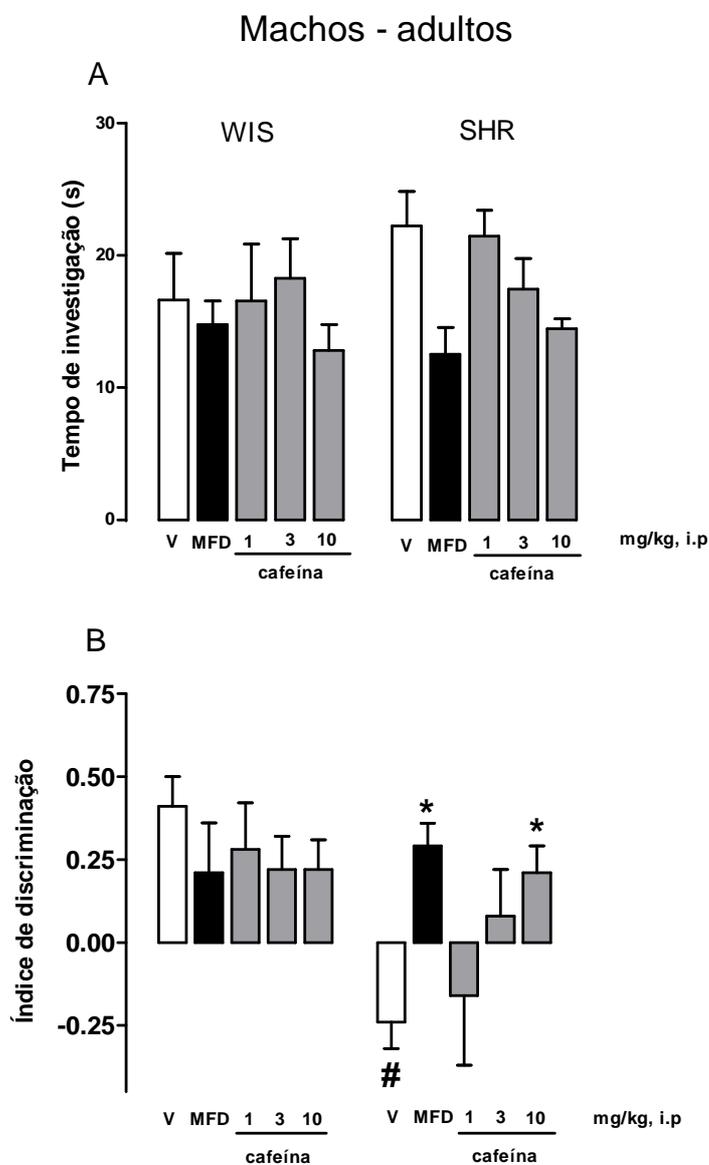
2 **Figura 9** – Comparação entre ratos fêmeas WIS e SHR adultos no teste de reconhecimento de
3 objetos. Após a fase de habituação no campo aberto, os animais foram expostos a 2 cubos
4 idênticos (A1 e A2) na fase de apresentação aos objetos e 30 min depois eles foram expostos a
5 outro cubo igual aos anteriores (A3) e a um objeto não familiar (B) na fase de reconhecimento
6 dos objetos. Os objetos B utilizados foram a pirâmide e o objeto na forma de “T”. (A) O tempo
7 de investigação (s) foi calculado através da soma do tempo de investigação dos objetos A1 e A2
8 durante a fase de apresentação aos objetos. (B) Já o índice de discriminação foi calculado pelo
9 tempo que os animais investigaram $(B-A3)/(B+A3)$. Os valores foram expressos como média \pm
10 erro padrão da média (E.P.M.), # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo “T” WIS. * $p < 0.05$ quando
11 comparado ao grupo “T” SHR (teste de Duncan). (n = 6-7).

12

13

4.2. Efeitos da administração aguda de metilfenidato ou cafeína na performance de ratos machos WIS e SHR no teste de reconhecimento de objetos

Os efeitos da administração aguda (i.p.) de metilfenidato ou cafeína, injetados 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, no tempo de investigação e no índice de reconhecimento, de ratos machos adultos WIS e SHR no teste de reconhecimento de objetos encontram-se nas Figuras 10A e 10B, respectivamente. No tempo de investigação a ANOVA de duas vias (linhagem x tratamento) não revelou efeito significativo para o fator linhagem [F(1,77)=1.22, $P=0.27$], tratamento [F(4,77)=2.46, $P=0.06$] ou para interação entre os fatores linhagem e tratamento [F(4,77)=0.85, $P=0.49$]. Já quando analisado o índice de reconhecimento a ANOVA de duas vias revelou efeito significante entre as linhagens [F(1,77)=8.54, $P\leq 0.05$], mas não entre os tratamentos [F(4,77)=0,88, $P=0.48$], no entanto significativo efeito foi encontrado ao analisar a interação entre os fatores linhagem e tratamento [F(4,77)=2.91, $P\leq 0.05$]. Confirmando esses resultados, subsequente teste de Duncan indicou que o grupo controle dos ratos SHR apresentam prejuízo no índice de reconhecimento quando comparados ao grupo controle dos ratos WIS ($P\leq 0.05$). Entretanto a administração (i.p.), de metilfenidato na dose de 2 mg/kg ou de cafeína na dose de 10 mg/kg, foram capazes de reverter o prejuízo na habilidade discriminatória dos ratos SHR, sem apresentar qualquer tipo de efeito nos ratos WIS.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

Figura 10 – Efeitos da administração de veiculo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 1, 3 e 10 mg/kg, 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos machos WIS e SHR adultos, no teste de reconhecimento do objeto. O tempo de investigação (s) foi calculado através da soma do tempo de investigação dos objetos A1 e A2 durante a fase de apresentação aos objetos. Já o índice de discriminação foi calculado pelo tempo que os animais investigaram (B-A3)/(B+A3) durante a fase de discriminação. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo V WIS. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo V SHR (teste de Duncan). (n = 8-10).

1 A tabela 1 ilustra o efeito do tratamento com metilfenidato ou cafeína na atividade
 2 locomotora de ratos machos das linhagens WIS e SHR, a medida foi realizada durante a fase de
 3 apresentação e de discriminação dos objetos na execução do teste de reconhecimento de objetos.
 4 Durante a fase de apresentação aos objetos, através da ANOVA de duas vias (linhagem X
 5 tratamento) nenhum efeito significativo foi encontrado para o fator linhagem [$F(1,77)=2.44$,
 6 $P=0.12$], tratamento [$F(4,77)=1.84$, $P=0.13$] ou para a interação entre os fatores linhagem e
 7 tratamento [$F(4,77)=1.13$, $P=0.35$]. O mesmo ocorreu durante a fase de reconhecimento dos
 8 objetos, onde não foi encontrado efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,77)=1.82$,
 9 $P=0.18$], tratamento [$F(4,77)=0.97$, $P=0.43$] e para a interação entre os fatores linhagem e
 10 tratamento [$F(4,77)=0.76$, $P=0.55$] no total de cruzamentos dos animais durante os 3 min de
 11 teste.

12
 13 **Tabela 1** – Efeitos da administração (i.p.) de veículo (V), metilfenidato (MFD) (2 mg/kg) ou
 14 cafeína (CAF) (1, 3 ou 10 mg/kg), 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, na atividade
 15 locomotora de ratos machos WIS e SHR durante a fase de apresentação e de discriminação de
 16 objetos, no teste do reconhecimento de objetos. (n = 8-10).

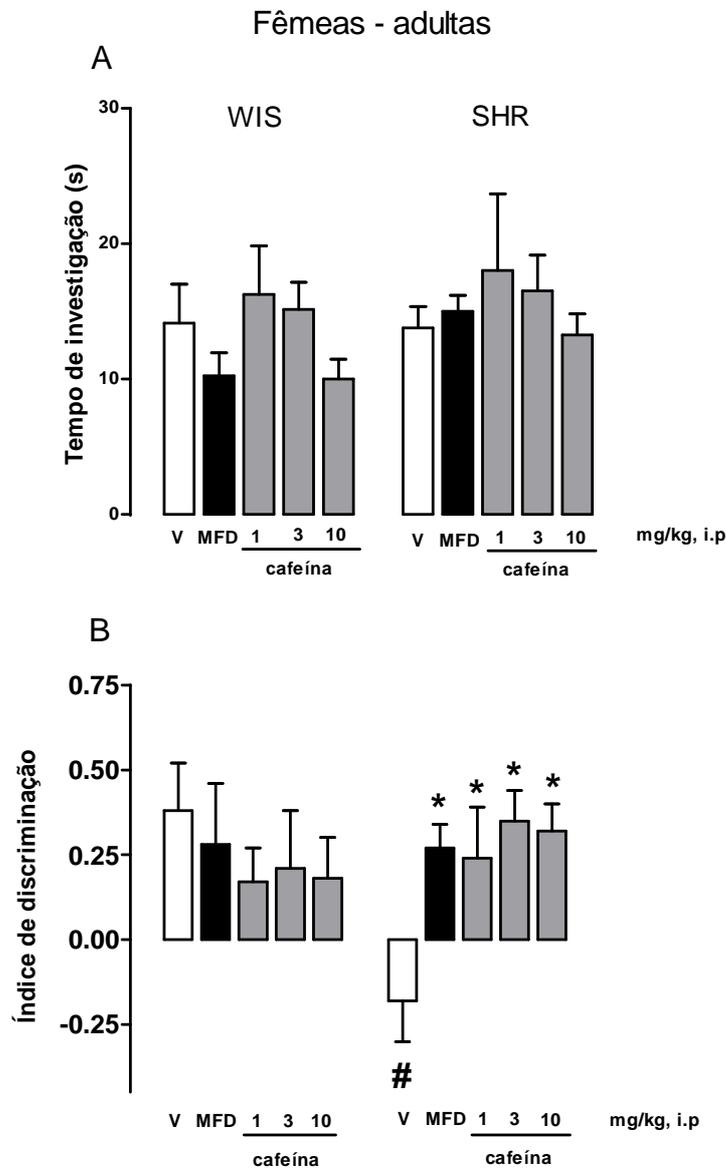
Tratamento (mg/kg, i.p.)		V	MFD 2	CAF 1	CAF 3	CAF 10
Fase	Linhagem	Nº de cruzamentos				
Apresentação aos objetos	WIS	85.25±5.02	85.37±3.82	100,1±5.37	82.87±4.96	94.20±5.83
	SHR	100,1±6.20	84.37±4.89	94.11±5.46	95.22±6.88	103.6±8.64
Reconhecimento dos objetos	WIS	69.75±8.66	81.37±2.28	82.78±4.69	69.62±7.23	84.20±5.77
	SHR	86.77±7.01	80.50±6.43	79.66±5.46	79.44±5.75	89.33±9.33

19
 20
 21
 22

4.3. Efeitos da administração aguda de metilfenidato ou cafeína na performance de ratos fêmeas WIS e SHR no teste de reconhecimento de objetos

Já que ratos fêmeas da linhagem SHR, assim como os ratos machos da mesma linhagem, demonstraram prejuízos no testes de reconhecimento dos objetos, avaliamos o efeito do tratamento com metilfenidato ou cafeína nas mesmas doses utilizadas para avaliar se a resposta ao tratamento em fêmeas é semelhante a encontrada em machos.

Sendo assim os efeitos da administração aguda (i.p.) de metilfenidato ou cafeína, injetados 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, no tempo de investigação e no índice de reconhecimento, de ratos fêmeas adultos WIS e SHR no teste de reconhecimento de objetos encontram-se nas Figuras 11A e 11B. No tempo de investigação a ANOVA de duas vias (linhagem x tratamento) não revelou efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,71)=1.73$, $P=0.19$], tratamento [$F(4,71)=1.48$, $P=0.21$] ou para interação entre os fatores linhagem e tratamento [$F(4,71)=0.29$, $P=0.88$]. Porém quando analisado o índice de reconhecimento a ANOVA de duas vias também não revelou efeito significante entre as linhagens [$F(1,71)=0.82$, $P=0.77$] e tratamentos [$F(4,71)=1.03$, $P=0.39$], no entanto, um significativo efeito foi encontrado na interação entre os fatores linhagem e tratamento [$F(4,71)=2.57$, $P\leq 0.05$]. Confirmando esses resultados, subsequente teste de Duncan indicou que o grupo controle dos ratos SHR apresentam prejuízo no índice de reconhecimento quando comparados ao grupo controle dos ratos WIS ($P\leq 0.05$). Foi também observado que a administração (i.p.), de metilfenidato na dose de 2 mg/kg ou de cafeína nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, foram capazes de reverter o prejuízo na habilidade discriminatória dos ratos SHR, sem apresentar qualquer tipo de efeito nos ratos WIS.



1
2 **Figura 11** – Efeitos da administração de veiculo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou caféina
3 (CAF) 1, 3 e 10 mg/kg, 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, no tempo de
4 investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas WIS e SHR adultos, no
5 teste de reconhecimento do objeto. O tempo de investigação (s) foi calculado através da soma do
6 tempo de investigação dos objetos A1 e A2 durante a fase de apresentação aos objetos. Já o
7 índice de discriminação foi calculado pelo tempo que os animais investigaram (B-A3)/(B+A3)
8 durante a fase de reconhecimento. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da
9 média (E.P.M.), # p<0.05 quando comparado ao grupo V WIS. *p<0.05 quando comparado ao
10 grupo V SHR (teste de Duncan). (n = 8-9).

1
2 A tabela 2 representa o efeito do tratamento com metilfenidato ou cafeína na atividade
3 locomotora de ratos fêmeas WIS e SHR, a medida foi realizada durante a fase de apresentação e
4 de discriminação dos objetos na execução do teste de reconhecimento de objetos. Durante a fase
5 de apresentação aos objetos, a ANOVA de duas vias (linhagem X tratamento) demonstrou que
6 nenhum efeito significativo foi encontrado para o fator linhagem [$F(1,71)=0.82$, $P=0.37$],
7 tratamento [$F(4,71)=0.72$, $P=0.58$] ou para a interação entre os fatores linhagem e tratamento
8 [$F(4,71)=1.61$, $P=0.18$] no total de cruzamentos dos animais durante os 3 min de teste. Já durante
9 a fase de reconhecimento dos objetos, a ANOVA de duas vias (linhagem X tratamento) revelou
10 efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,71)=4.55$, $P\leq 0.05$] na atividade locomotora dos
11 animais, porém não foi encontrado efeito significativo para o fator tratamento [$F(4,71)=0.68$,
12 $P=0.61$] ou na interação entre os fatores linhagem e tratamento [$F(4,71)=1.54$, $P=0.20$]. Análises
13 subsequentes através do teste de Duncan não indicaram diferença significativa na atividade
14 locomotora entre os grupos controles das duas linhagens utilizadas.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

1 **Tabela 2** – Efeitos da administração (i.p.) de veiculo (V), metilfenidato (MFD) (2 mg/kg) ou
 2 cafeína (CAF) (1, 3 ou 10 mg/kg), 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, na atividade
 3 locomotora de ratos fêmeas WIS e SHR durante a fase de apresentação e de discriminação de
 4 objetos, no teste do reconhecimento de objetos. (n = 8-9).
 5
 6

Tratamento (mg/kg, i.p.)		V	MFD 2	CAF 1	CAF 3	CAF 10
Fase	Linhagem	Nº de cruzamentos				
Apresentação aos objetos	WIS	80.25±5.41	90.78±7.45	89.75±4.43	100.37±10.8	101.00±5.6
	SHR	96.75±4.68	105.22±6.6	94.28±5.38	91.75±6.15	93,25±6.99
Reconhecimento dos objetos	WIS	69.75±8.09	68.00±5.00	73.25±8.20	81.87±10.23	82.62±4.98
	SHR	80.0±5.45	97.44±5.53	78.41±6.79	83.12±7.09	83.62±7.12

7
 8
 9

10 Após verificar que ratos SHR machos e fêmeas apresentam prejuízo na tarefa de
 11 reconhecimento de objetos quando estes possuem características muito semelhantes e ainda após
 12 avaliar a melhora no desempenho de ambos os gêneros após tratamento com metilfenidato ou
 13 cafeína, optamos por utilizar o gênero fêmea para prosseguir nossas investigações, já que estamos
 14 utilizando animais adultos e o TDAH na idade adulta é mais comum em mulheres e ainda porque
 15 ratos fêmeas da linhagem SHR demonstraram ser mais sensíveis ao tratamento com cafeína.

16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25

1 **4.4. Efeitos 24 horas após a administração aguda de metilfenidato ou cafeína no teste de** 2 **reconhecimento de objetos em ratos fêmeas WIS e SHR**

3
4
5
6 Para avaliar se o efeito do metilfenidato e da cafeína estavam realmente ocorrendo durante
7 a fase de apresentação aos objetos, no momento em que os animais necessitam adquirir as
8 informações, ou se esse efeito estaria ocorrendo apenas durante a evocação das informações
9 aprendidas que ocorre na fase de reconhecimento dos objetos. Além disso, para avaliar se os
10 animais necessitam estar sobre o efeito das drogas para que possam apresentar a melhora no
11 desempenho, um novo grupo de animais foi avaliado.

12 Para responder essas questões, foram selecionadas as doses de 2 mg/kg de metilfenidato e
13 a dose de 3 mg/kg de cafeína, já que essas doses apresentaram efeito em outros grupos avaliados.
14 Os animais receberam uma administração aguda (i.p.) de veiculo, cafeína ou metilfenidato,
15 injetados 30 min antes da fase de apresentação aos objetos. Já a fase de reconhecimento dos
16 objetos, que antes era realizada 30 min após a fase de apresentação, foi realizada 24 horas após
17 esta fase.

18 Os resultados encontrados estão representados nas figuras 12A e 12B. Como pode ser
19 observado no tempo de investigação a ANOVA de duas vias (linhagem x tratamento) não revelou
20 efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,41)=0.38$, $P=0.85$], tratamento [$F(2,41)=1.87$,
21 $P=0.17$] ou para interação entre os fatores linhagem e tratamento [$F(2,41)=0.32$, $P=0.72$]. Já
22 quando analisado o índice de reconhecimento a ANOVA de duas vias também não revelou efeito
23 significativo entre as linhagens [$F(1,41)=2.06$, $P=0.16$] e tratamentos [$F(2,41)=2,54$, $P=0.91$]. No
24 entanto, um significativo efeito foi encontrado na interação entre os fatores linhagem e tratamento
25 [$F(2,41)=10.27$, $P\leq 0.001$]. Confirmando esses resultados, análises *post-hoc* indicaram que o
26 grupo controle dos ratos SHR apresentam prejuízo no índice de reconhecimento quando

1 comparados ao grupo controle dos ratos WIS ($P \leq 0.05$). E ainda, a administração (i.p.), de
2 metilfenidato na dose de 2 mg/kg ou de cafeína na dose de 3 mg/kg, foram capazes de reverter o
3 prejuízo na habilidade discriminatória dos ratos SHR, sem apresentar qualquer tipo de efeito nos
4 ratos WIS, mesmo quando testados 24 horas após a administração.

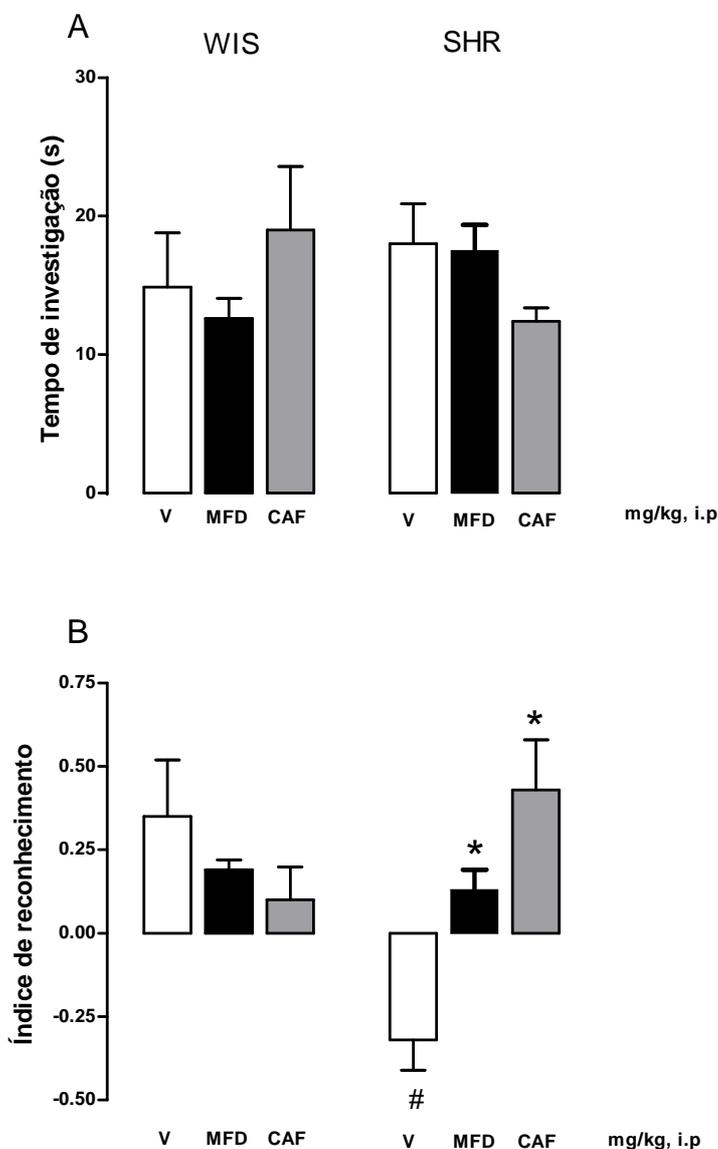
5

6

7

8

Fêmeas - adultas

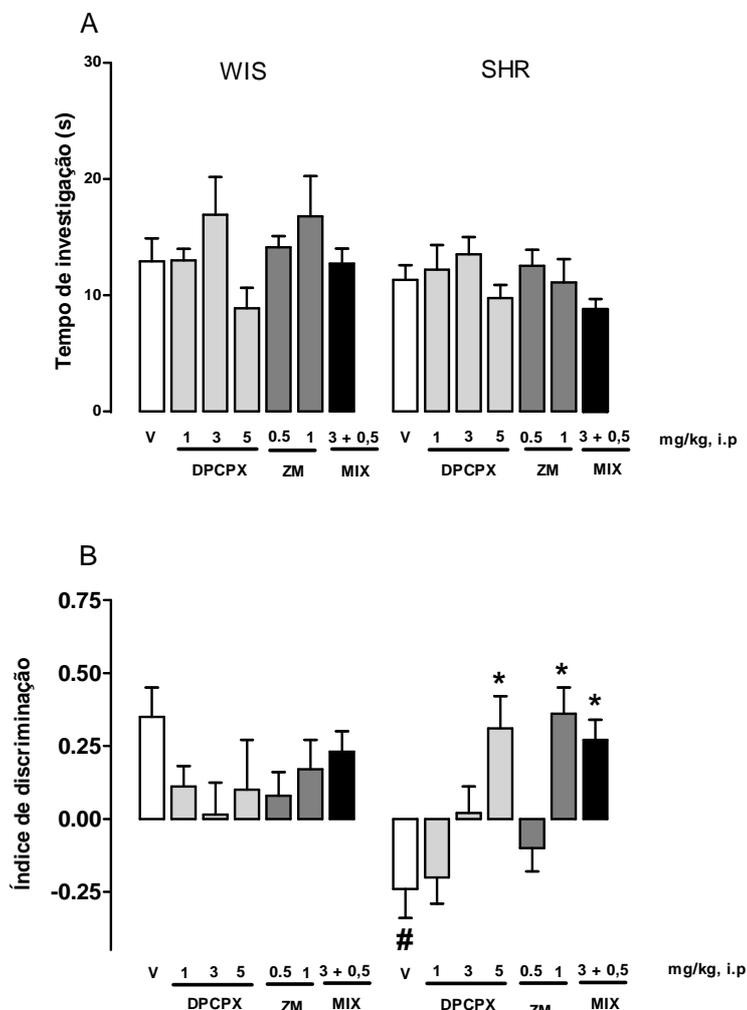


1
2 **Figura 12** – Efeitos da administração de V, MFD 2 mg/kg e de cafeína CAF 3 mg/kg, 30 min
3 antes da fase de apresentação aos objetos, no tempo de investigação (A) e no índice de
4 reconhecimento, realizado 24 horas após a fase de apresentação aos objetos (B), em ratos fêmeas
5 WIS e SHR adultos, no teste de reconhecimento do objeto. O tempo de investigação (s) foi
6 calculado através da soma do tempo de investigação dos objetos A1 e A2 durante a fase de
7 apresentação aos objetos. Já o índice de discriminação foi calculado pelo tempo que os animais
8 investigaram (B-A3)/(B+A3) durante a fase de reconhecimento. Os valores foram expressos
9 como média ± erro padrão da média (E.P.M.), # p<0.05 quando comparado ao grupo V WIS.
10 *p<0.05 quando comparado ao grupo V SHR (teste de Duncan). (n = 7-8).

1 **4.5. Efeitos da administração aguda de antagonistas seletivos para receptores**
2 **adenosinérgicos A1 e A2A no teste de reconhecimento de objetos em ratos fêmeas WIS e**
3 **SHR.**

4
5 Nas figuras 13A e 13B encontram-se os resultados da administração aguda (i.p.) dos
6 antagonistas seletivos para receptores de adenosina A1 (DPCPX) nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg e
7 A2A (ZM241385) nas doses de 0,5 e 1 mg/kg e também o efeito da associação das doses de 3
8 mg/kg de DPCPX e de 0,5 mg/kg de ZM241385 (MIX), injetados 30 min antes da fase de
9 apresentação aos objetos, no tempo de investigação e no índice de reconhecimento, de ratos
10 fêmeas adultos WIS e SHR. No tempo de investigação a ANOVA de duas vias (linhagem x
11 tratamento) revelou efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,102)=5.13, P\leq 0.05$], mas não
12 para o fator tratamento [$F(6,102)=2.11, P=0.06$] ou para a interação entre os fatores linhagem e
13 tratamento [$F(6, 102)=0.66, P=0.68$]. Já quando analisado o índice de reconhecimento a ANOVA
14 de duas vias (linhagem e tratamento) revelou efeito significativo para o fator linhagem
15 [$F(1,102)=4.29, P\leq 0.05$], tratamento [$F(6,102)=3.02, P\leq 0.05$] e para a interação entre os fatores
16 linhagem e tratamento [$F(6,102)=4.15, p\leq 0.001$]. Confirmando esses resultados, subsequente
17 teste de Duncan indicou que o grupo controle dos ratos SHR apresentam prejuízo no índice de
18 reconhecimento quando comparados ao grupo controle dos ratos WIS e também que a
19 administração aguda de DPCPX na dose de 5 mg/kg, ZM241385 na dose de 1 mg/kg, e a
20 associação das doses de 3 mg/kg de DPCPX e 0,5 mg/kg de ZM241385 reverteram o prejuízo na
21 habilidade discriminatória dos ratos SHR ($P<0.05$), enquanto nenhum efeito foi encontrado para
22 os ratos WIS após administração das drogas.

Fêmeas - adultas



2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

Figura 13 – Efeitos da administração de antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos A1 - DPCPX (1, 3 e 5 mg/kg) e A2A – ZM241385 (0,5 e 1 mg/kg) e também da administração combinada de DPCPX (3 mg/kg) e ZM (0,5 mg/kg) (MIX), 30 min antes da fase de apresentação aos objetos, no tempo de investigação (A) e no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas WIS e SHR, no teste de reconhecimento do objeto. O tempo de investigação (s) foi calculado através da soma do tempo de investigação dos objetos A1 e A2 durante a fase de apresentação aos objetos. Já o índice de discriminação foi calculado pelo tempo que os animais investigaram $(B-A3)/(B+A3)$ durante a fase de reconhecimento. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo V WIS. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo V SHR (teste de Duncan). (n = 8-10).

1 A tabela 3 representa o efeito do tratamento agudo com os antagonistas seletivos na
2 atividade locomotora de ratos fêmeas WIS e SHR, a medida foi realizada durante a fase de
3 apresentação e de discriminação dos objetos. Durante a fase de apresentação aos objetos, através
4 da ANOVA de duas vias (linhagem X tratamento) um significativo efeito foi encontrado para o
5 fator linhagem [$F(1,102)=11.4, P\leq 0.001$] e para o fator tratamento [$F(6,102)=2.4, P\leq 0.05$] no
6 total de cruzamentos dos animais durante os 3 min de teste. No entanto, a análise não revelou
7 efeito significativo na interação entre os fatores linhagem e tratamento [$F(6,102)=1.27, P=0.28$].
8 Comparações adicionais não revelaram diferenças significantes entre os grupos controles das
9 linhagens WIS e SHR ou em relação aos grupos tratados, quando comparados ao grupo controle
10 da mesma linhagem. Já durante a fase de reconhecimento dos objetos, a ANOVA de duas vias
11 (linhagem X tratamento) revelou efeito significativo para o fator linhagem [$F(1,102)=6.7,$
12 $P\leq 0.01$], mas não para o fator tratamento [$F(6,102)=0.45, P=0.84$] ou para a interação entre os
13 fatores linhagem e tratamento [$F(6,102)=1.05, P=0.40$]. Comparações *post-hoc* adicionais não
14 revelaram diferenças significantes entre os grupos controles das linhagens WIS e SHR

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

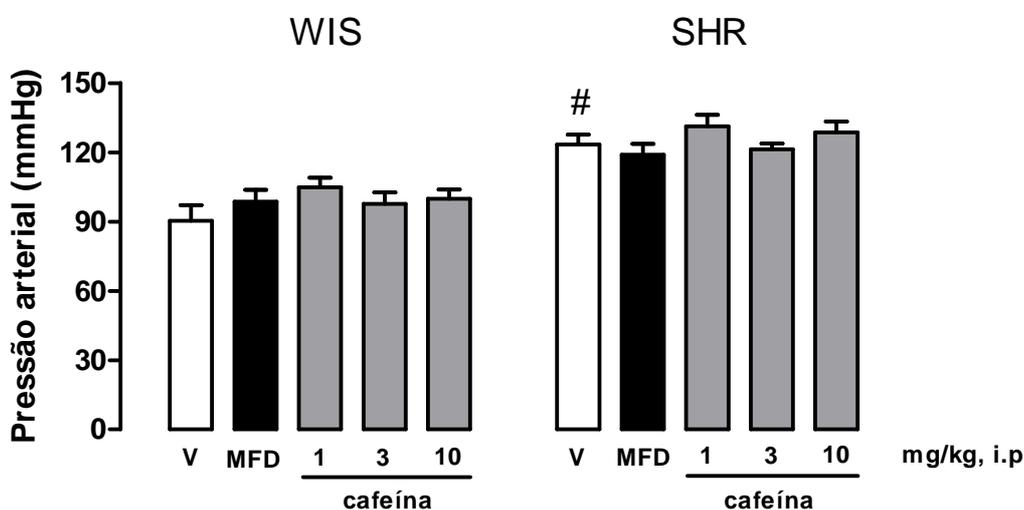
1 **Tabela 3** – Efeitos da administração (i.p.) de V, antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos
 2 A1 - DPCPX (1, 3 e 5 mg/kg), A2A – ZM241385 (0,5 e 1 mg/kg) e também da administração
 3 combinada de DPCPX (3 mg/kg) e ZM (0,5 mg/kg) (MIX), 30 min antes da fase de apresentação aos
 4 objetos, na atividade locomotora de ratos fêmeas WIS e SHR durante a fase de apresentação e de
 5 discriminação de objetos, no teste do reconhecimento de objetos. (n = 8-10).

Tratamento (mg/kg, i.p.)		V	DPCPX 1	DPCPX 3	DPCPX 5	ZM 0.5	ZM 1	MIX
Fase	Linh	Nº de cruzamentos						
Apresentação aos objetos	WIS	84.4±2.9	76.6±5.0	71.4±4.3	79.0±4.7	78.2±4.0	69.2±1.6	83.0±5.1
	SHR	86.8±3.6	73.5±6.9	81.7±4.9	86.6±2.9	95.9±6.6	86.2±6.8	90.9±4.2
Reconhecimento Dos objetos	WIS	72.3±3.8	72.7±4.1	61.7±4.8	70.5±6.4	73.2±6.9	62.1±5.2	70.0±3.6
	SHR	81.2±6.8	73.9±9.5	74.2±8.1	79.7±4.3	68.4±5.7	85.9±9.2	79.9±4.3

4.6. Efeitos da administração aguda de metilfenidato, cafeína e de antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos A1 e A2A na pressão arterial de ratos fêmeas WIS e SHR

Para avaliar se os déficits cognitivos apresentados pelos ratos SHR são diretamente relacionados com a hipertensão desses animais ou se as duas patologias possuem mecanismos distintos, a pressão sanguínea de ambas as linhagens após o tratamento agudo com metilfenidato, cafeína ou com os antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos, foi avaliada. A figura 14 representa os resultados dos efeitos da administração (i.p.) aguda de veículo, metilfenidato (2 mg/kg) e cafeína (1, 3 e 10 mg/kg) sob a pressão arterial (mmHg) de ratos fêmeas adultos WIS e SHR. A ANOVA de duas vias (linhagem x tratamento) revelou significativo efeito para o fator linhagem [F(1,35)=77.20, $P \leq 0.001$], mas não foi encontrado efeito significativo para o fator tratamento [F(4,35)=1.94, $P=0.12$] ou para a interação entre os fatores linhagem e tratamento [F(4,35)=0.44, $P=0.78$]. Comparações adicionais através do teste de Duncan, assim como já era

1 esperado, demonstraram que os animais SHR tratados com solução veiculo são hipertensivos em
2 relação aos animais WIS também tratados com solução veiculo ($P \leq 0.001$). No entanto a
3 administração de metilfenidato ou de cafeína, 30 min antes de mensurar a pressão arterial, nas
4 mesmas doses que foram capazes de reverter os prejuízos cognitivos dos ratos SHR no teste do
5 reconhecimento de objetos, não causaram alterações significantes nos valores da pressão arterial
6 tanto em ratos SHR quanto em ratos WIS.



7
8

9 **Figura 14** – Efeitos da administração (i.p.) V, MFD (2 mg/kg) ou CAF (1, 3 e 10 mg/kg), sob a
10 pressão arterial (média \pm E.P.M., in mmHg), em ratos fêmeas WIS e SHR. # $p < 0,05$ comparado
11 aos ratos WIS controle. (n = 4)

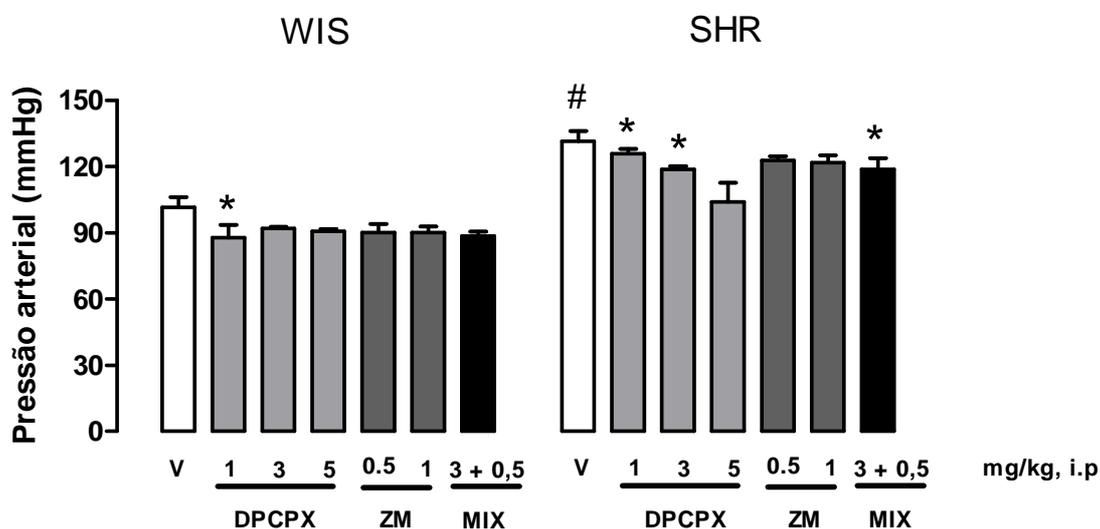
12
13

14 Já a figura 15 representa os resultados dos efeitos da administração (i.p.) aguda de veiculo ou
15 dos antagonistas seletivos para receptores adenosinérgicos A1 – DPCPX nas doses de 1, 3 e 5
16 mg/kg, A2A – ZM241385 nas doses de 0,5 e 1 mg/kg e também da associação das doses de 3
17 mg/kg de DPCPX e de 0,5 mg/kg de ZM241385 (MIX), sob a pressão arterial (mmHg) de ratos
18 fêmeas adultos WIS e SHR. A análise de variância realizada através da ANOVA de duas vias

1 (linhagem x tratamento) revelou significante efeito para o fator linhagem [F(1,41)=200.8,
 2 $P \leq 0.001$] e para o fator tratamento [F(6,41)=4.48, $P \leq 0.001$]. Porém não foi encontrado efeito
 3 significativo para a interação entre os fatores linhagem e tratamento [F(6,41)=1.9, $P=0.09$].

4 De acordo com os estudos anteriores, comparações adicionais através do teste de Duncan
 5 demonstraram que os animais SHR tratados com veiculo são hipertensos em relação aos animais
 6 WIS tratados com a mesma solução ($P \leq 0.001$). E demonstrou ainda que os grupos de animais
 7 SHR tratados com as doses de 3 e 5 mg/kg de DPCPX e também com a associação de 3 mg/kg de
 8 DPCPX e 0,5 mg/kg de ZM apresentaram diminuição da pressão arterial quando comparados ao
 9 grupo controle dos ratos SHR. Já quando analisado o efeito dos tratamentos na linhagem WIS,
 10 apenas a dose de 1 mg/kg de DPCPX diminuiu a pressão arterial desses animais quando
 11 comparados ao grupo controle da mesma linhagem ($p \leq 0,05$).

12



13

14

15 **Figura 15** – Efeitos da administração (i.p.) de solução veiculo ou dos antagonistas seletivos para
 16 receptores adenosinérgicos A1 - DPCPX (1, 3 e 5 mg/kg) e A2A – ZM241385 (0,5 e 1 mg/kg) e
 17 também da associação das doses de 3 mg/kg de DPCPX e de 0,5 mg/kg de ZM241385 (MIX),
 18 sob a pressão arterial (média \pm E.P.M., in mmHg), em ratos fêmeas WIS e SHR. # $p < 0,05$
 19 comparado aos ratos WIS controle. (n = 3 - 4).

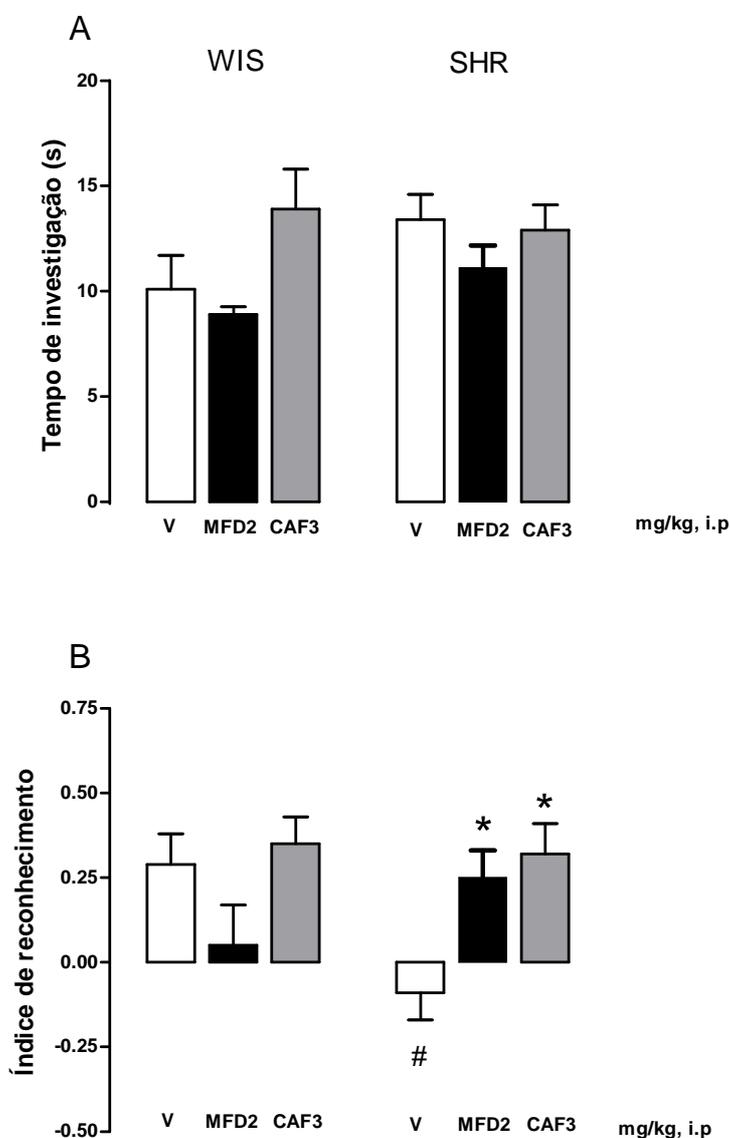
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

Resultados Tratamiento Repetido

1 **4.7. Efeitos do tratamento repetido com metilfenidato ou cafeína, durante a idade adulta, no** 2 **teste de reconhecimento de objetos, em ratos fêmeas WIS e SHR**

3
4 Os efeitos do tratamento repetido durante 14 dias com veiculo, metilfenidato (2mg/kg) ou
5 cafeína (3 mg/kg), durante a idade adulta, em ratos fêmeas WIS e SHR, no tempo de
6 investigação e no índice de reconhecimento. A fase de habituação teve início 24h após o ultimo
7 dia de tratamento e os resultados encontram-se representados nas figuras 16A e 16B. No tempo
8 de investigação a ANOVA de duas vias (linhagem x tratamento) não revelou efeito significativo
9 para o fator linhagem [F(1,61)=2.14, $P=0.15$]. Quando analisado o fator tratamento, significativo
10 efeito foi encontrado [F(2,61)=3.71, $P\leq 0,05$], no entanto o mesmo não ocorreu quando analisado
11 a interação entre os fatores linhagem e tratamento [F(2,61)=1.49, $P=0.23$]. Comparações
12 adicionais não revelaram diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle da
13 respectiva linhagem. Ao analisar o índice de reconhecimento a ANOVA de duas vias também
14 não revelou efeito significativo entre as linhagens [F(1,61)=0.70, $P=0.40$], no entanto revelou
15 efeito significativo para o fator tratamento [F(2,61)=3.39, $P\leq 0,05$], e para a interação entre os
16 fatores linhagem e tratamento [F(2,61)=4.89, $P\leq 0.05$]. Confirmando esses resultados,
17 subseqüentes comparações *post-hoc* indicaram que o grupo controle dos ratos SHR apresentam
18 prejuízo no índice de reconhecimento quando comparados ao grupo controle dos ratos WIS
19 ($P\leq 0.05$). No entanto, a administração (i.p.) repetida, de metilfenidato na dose de 2 mg/kg ou de
20 cafeína na dose de 3 mg/kg, foi capaz de reverter o prejuízo na habilidade discriminatória dos
21 ratos SHR, sem apresentar qualquer tipo de efeito nos ratos WIS (Fig 16B).

Fêmeas - adultas

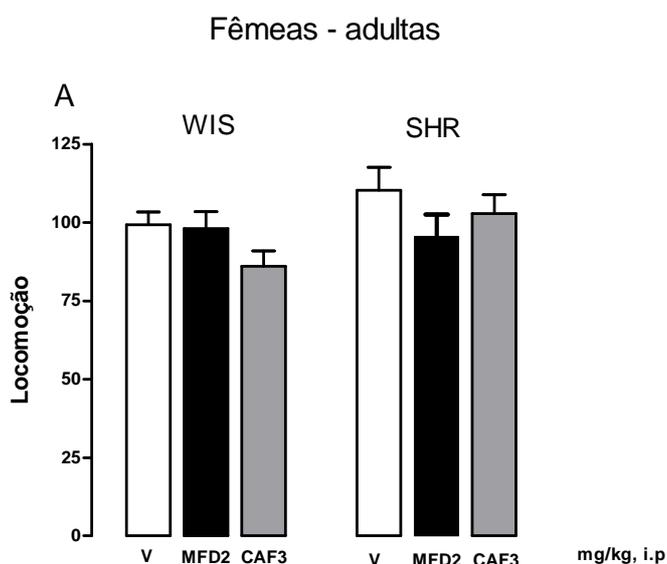


1
2 **Figura 16** – Efeitos da administração (i.p.) repetida (14 dias), de veículo (V), metilfenidato
3 (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg, durante a idade adulta no tempo de investigação (A)
4 e no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas WIS e SHR, no teste de reconhecimento do
5 objeto. O tempo de investigação (s) foi calculado através da soma do tempo de investigação dos
6 objetos A1 e A2 durante a fase de apresentação. Já o índice de discriminação foi calculado pelo
7 tempo que os animais investigaram (B-A3)/(B+A3) durante a fase de discriminação. Os valores
8 foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.),[#] p<0.05 quando comparado ao
9 grupo V WIS. *p<0.05 quando comparado ao grupo V SHR (teste de Duncan). (n = 8 – 10).

10
11

1 A figura 17 sumariza o efeito do tratamento repetido com veiculo, metilfenidato ou
2 cafeína na atividade locomotora, durante a idade adulta, de ratos WIS e SHR fêmeas, a medida
3 foi realizada durante a fase de apresentação aos objetos durante a execução do teste. Através da
4 ANOVA de duas vias (linhagem X tratamento) nenhum efeito significativo foi encontrado para o
5 fator linhagem [$F(1,61)=2.84$, $P=0.09$], tratamento [$F(2,61)=1.52$, $P=0.23$], ou para a interação
6 entre os fatores linhagens e tratamento [$F(2,61)=1.38$, $P=0.26$] no total de cruzamentos dos
7 animais durante os 3 min de testes.

8



9

10

11 **Figura 17** – Efeitos da administração (i.p.) repetida (14 dias) durante a idade adulta, de veiculo
12 (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg na atividade locomotora de ratos
13 WIS e SHR fêmeas durante a fase de apresentação dos objetos, no teste do reconhecimento de
14 objetos. (n = 8 – 10).

15

16

17

18

1 **4.8. Efeitos do tratamento repetido com metilfenidato ou cafeína, no teste de** 2 **reconhecimento de objetos, durante a adolescência, de ratos fêmeas WIS e SHR**

3
4 Os efeitos do tratamento repetido durante 14 dias com solução veiculo, metilfenidato
5 (2mg/kg) ou cafeína (3 mg/kg), durante o início da adolescência (20° ao 34° dia PN) de ratos WIS
6 e SHR fêmeas, no tempo de investigação e no índice de reconhecimento realizados na idade
7 adulta (2 meses depois da ultima administração das drogas) encontram-se representados nas
8 figuras 18A e 18B, respectivamente. Esses experimentos foram realizados para avaliar a
9 persistência do efeito da administração repetida dessas drogas quando utilizadas como tratamento
10 durante a adolescência, que é um período crítico, onde várias modificações estão ocorrendo em
11 todo o SNC tanto humanos como de roedores.

12 No tempo de investigação a ANOVA de duas vias (linhagem x tratamento) revelou efeito
13 significativo para o fator linhagem [$F(1,49)=5.59, P<0.05$]. No entanto nenhum significativo
14 efeito foi encontrado para o fator tratamento [$F(2,49)=1.60, P\leq 0.20$], já para a interação entre os
15 fatores linhagem e tratamento significativo efeito foi encontrado [$F(2,49)=3.36, P<0.05$].
16 Comparações adicionais através do teste de Duncan revelou que os ratos WIS tratados com a
17 dose de 3 mg/kg de cafeína apresentaram aumento no tempo de investigação quando comparado
18 ao grupo de ratos WIS tratados com veiculo. Quando analisado o índice de reconhecimento a
19 ANOVA de duas vias também não revelou efeito significativo entre as linhagens [$F(1,49)=0.17,$
20 $P=0.68$], ou entre os diferentes tratamentos [$F(2,49)=0.05, P=0.95$], já quando analisado a
21 interação entre os fatores linhagem e tratamento, efeito significativo foi encontrado
22 [$F(2,49)=11.68, P\leq 0.001$]. Confirmando esses resultados, subsequente teste de Duncan indicou
23 que o grupo controle dos ratos SHR apresentam prejuízo no índice de reconhecimento quando
24 comparados ao grupo controle dos ratos WIS ($P\leq 0.05$). Como pode ser observado, a

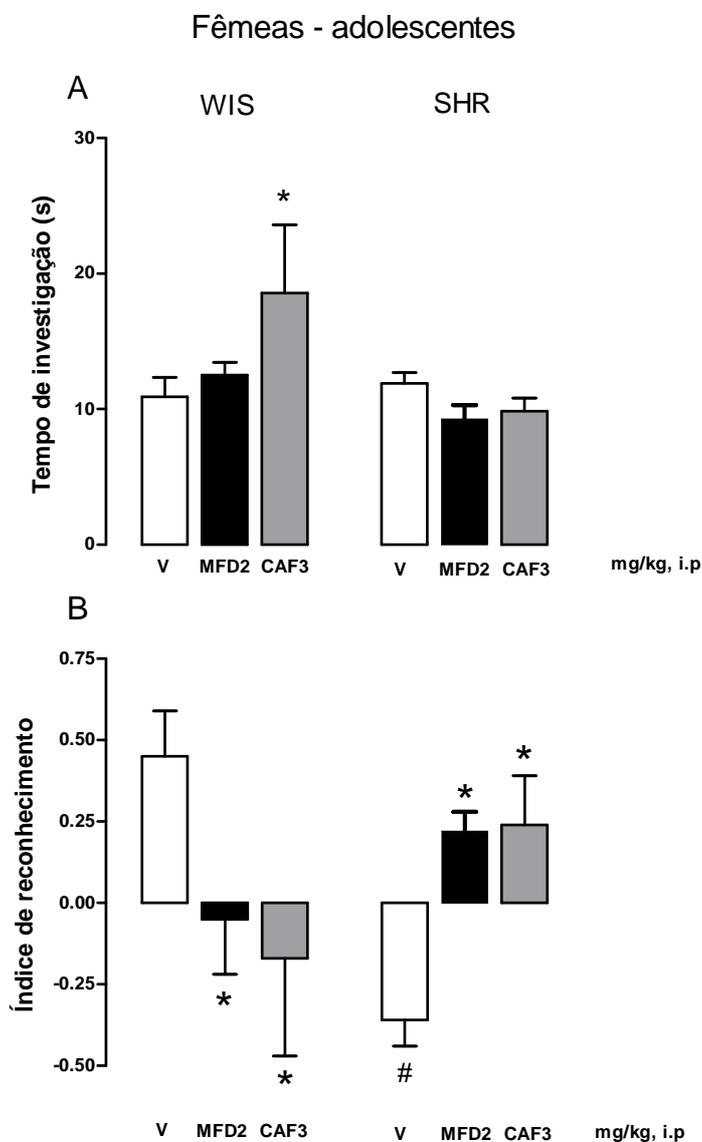
1 administração (i.p.) repetida de metilfenidato na dose de 2 mg/kg ou de cafeína na dose de 3
2 mg/kg durante a adolescência dos ratos SHR, foram capazes de reverterem o prejuízo na
3 habilidade discriminatória apresentado por esses animais. No entanto, surpreendentemente, as
4 mesmas doses de ambas as drogas que reverteram o prejuízo no índice de discriminação em ratos
5 SHR causaram prejuízo nesta mesma habilidade em ratos WIS, os quais apresentavam eficiente
6 capacidade de discriminação entre o objeto novo e o familiar nos experimentos realizados
7 anteriormente.

8

9

10

11



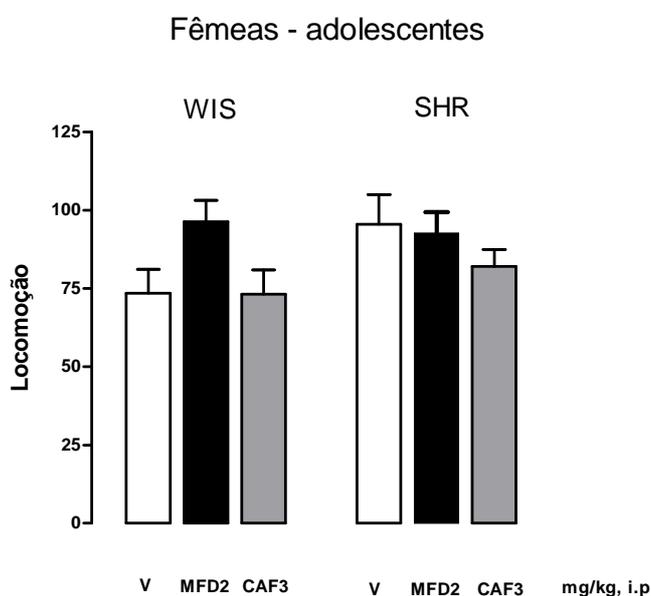
1

2

3 **Figura 18** – Efeitos da administração (i.p.) repetida (14 dias), de veículo (V), metilfenidato
 4 (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg, durante adolescência, no tempo de investigação (A) e
 5 no índice de reconhecimento (B) em ratos fêmeas adultos WIS e SHR adultos, no teste de
 6 reconhecimento do objeto. O tempo de investigação (s) foi calculado através da soma do tempo
 7 de investigação dos objetos A1 e A2 durante a fase de apresentação aos objetos. Já o índice de
 8 discriminação foi calculado pelo tempo que os animais investigaram $(B-A3)/(B+A3)$ durante a
 9 fase de discriminação. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.),[#]
 10 $p < 0.05$ quando comparado ao grupo V WIS. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo V SHR (teste
 11 de Duncan). (n = 10 – 12).

1 A figura 19 expressa o efeito do tratamento repetido durante a adolescência com veículo,
2 metilfenidato ou cafeína na atividade locomotora, durante a idade adulta de ratos fêmeas WIS e
3 SHR. Através da ANOVA de duas vias (linhagem X tratamento) nenhum efeito significativo foi
4 encontrado para o fator linhagem [$F(1,49)=2.02, P=0.16$], tratamento [$F(2,49)=1.96, P=0.15$], ou
5 para a interação entre os fatores linhagem e tratamento [$F(2,49)=1.50, P=0.23$] no total de
6 cruzamentos dos animais durante os 3 min de avaliação.

7
8



9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

Figura 19 – Efeitos da administração (i.p.) repetida (14 dias) durante a adolescência, de veículo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg na atividade locomotora de ratos fêmeas WIS e SHR adultos, durante a fase de apresentação dos objetos, no teste do reconhecimento de objetos. (n = 10 -12).

1 **4.9. Efeitos do tratamento repetido com metilfenidato ou cafeína, durante a idade adulta ou** 2 **durante a adolescência, na pressão arterial de ratos fêmeas WIS e SHR**

3
4 Novamente para avaliar se os déficits cognitivos apresentados pelos ratos SHR estão
5 diretamente relacionados com a hipertensão desses animais, a pressão sanguínea foi avaliada. A
6 figura 20 ilustra os resultados dos efeitos da administração (i.p.) repetida de veiculo,
7 metilfenidato (2 mg/kg) ou cafeína (3 mg/kg) durante a idade adulta, sob a pressão arterial
8 (mmHg) de ratos fêmeas adultos, das linhagens WIS e SHR. A ANOVA de duas vias (linhagem
9 x tratamento) revelou significativo efeito para o fator linhagem [$F(1,22)=39.7$, $P\leq 0.001$] e
10 também para o fator tratamento [$F(2,22)=5.52$, $P\leq 0.05$], mas não para a interação entre os fatores
11 linhagem e tratamento [$F(2,22)=1.56$, $P=0.23$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstraram
12 que os animais SHR tratados com veiculo são hipertensos em relação aos animais WIS tratados
13 com a mesma solução ($P\leq 0.001$). No entanto a administração repetida de metilfenidato, na
14 mesma dose que foi capaz de reverter os prejuízos cognitivos dos ratos SHR no teste do
15 reconhecimento de objetos, causou uma significativa diminuição nos valores da pressão arterial
16 dos ratos SHR, sem causar qualquer tipo de alteração na pressão arterial dos ratos WIS.

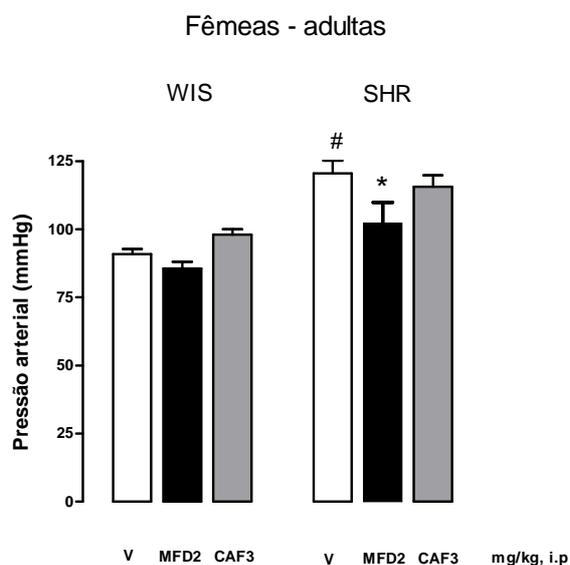
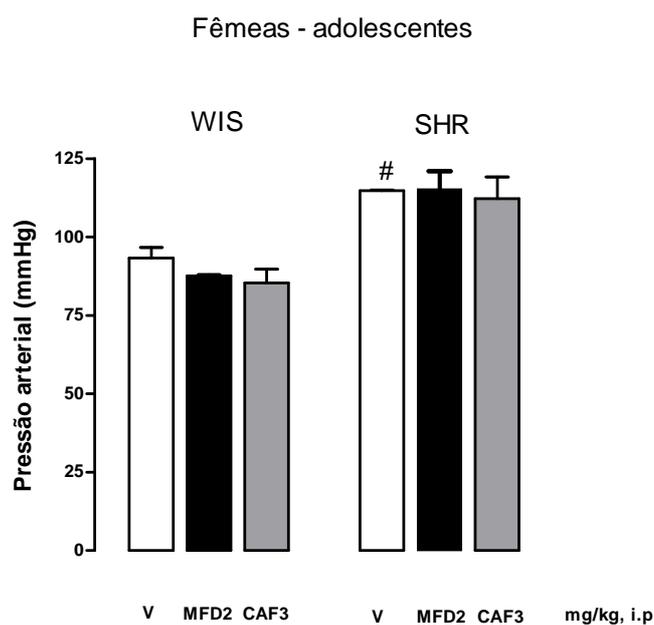


Figura 20 – Efeitos da administração (i.p.) repetida, durante a idade adulta, de veículo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg, sob a pressão arterial (média \pm E.P.M., in mmHg), em ratos fêmeas WIS e SHR adultos. # $p < 0,05$ comparado aos ratos WIS tratados com V, * $p < 0,05$ comparado aos ratos SHR tratados com V.

Já a figura 21 sumariza os resultados dos efeitos da administração (i.p.) repetida de veículo, metilfenidato (2 mg/kg) ou cafeína (3 mg/kg), administrados durante a adolescência, sob a pressão arterial (mmHg) de ratos fêmeas adultos, das linhagens WIS e SHR. A análise de variância realizada através da ANOVA de duas vias (linhagem x tratamento) revelou significativo efeito para o fator linhagem [$F(1,14)=37.15$, $P \leq 0.001$]. Porém não revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F(2,14)=0.58$, $P=0.57$] ou a interação entre os fatores linhagem e tratamento [$F(2,14)=0.24$, $P=0.79$]. Reproduzindo dados anteriores, comparações adicionais demonstraram que os animais SHR tratados com veículo são hipertensos em relação aos animais WIS também tratados com veículo ($P \leq 0.05$). No entanto a administração repetida de

1 metilfenidato ou de cafeína, nas mesmas doses que foram capazes de reverter os prejuízos
2 cognitivos dos ratos SHR e de causar prejuízos nos ratos WIS no teste do reconhecimento de
3 objetos, não causou alterações significantes nos valores da pressão arterial tanto em ratos SHR
4 quanto em ratos WIS.

5



6

7

8 **Figura 21** – Efeitos da administração (i.p.) repetida, durante a adolescência, de veículo, V,
9 metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg, sob a pressão arterial (média \pm E.P.M.,
10 in mmHg), em ratos fêmeas WIS e SHR adultos. # $p < 0,05$ comparado aos ratos WIS tratados
11 com veículo.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **4.10. Efeitos do tratamento repetido com metilfenidato ou cafeína, durante a idade adulta** 2 **ou durante a adolescência, sob o peso corporal de ratos fêmeas WIS e SHR**

3
4 As figuras 22A e 22B ilustram o peso corporal dos animais da linhagem WIS e SHR, que
5 foram medidos de dois em dois dias durante o tratamento repetido (14 dias) com veiculo,
6 metilfenidato ou cafeína tanto durante o tratamento na adolescência quanto durante o tratamento
7 na idade adulta. Esse procedimento foi realizado para verificar o efeito das drogas utilizadas na
8 ingestão de alimentos e na manutenção do peso corporal já que estudos demonstram a diminuição
9 da ingestão alimentar e uma conseqüente perda de peso corporal durante a administração
10 prolongada das drogas utilizadas tanto em humano como em roedores (Rapport e Moffitt, 2002;
11 Gray *et al.*, 2007).

12 Na figura 22A pode ser observado que a administração repetida tanto de metilfenidato
13 quanto de cafeína, durante a idade adulta, não foi capaz de alterar o ganho de peso corporal de
14 ambas as linhagens durante os 14 dias de tratamento. Através da ANOVA de três vias (linhagem
15 X tratamento X repetição), a única diferença que pode ser observada é a já existente entre o
16 tamanho e conseqüentemente entre o peso corporal das linhagens WIS e SHR, que não sofreram
17 alterações [$F(1,26)=28.77, P\leq 0.001$]. Já que não houve diferenças significativas entre os outros
18 parâmetros analisados, além do fator repetição [$F(6,156)=9.56, P\leq 0.001$].

19 Resultados semelhantes foram encontrados com o tratamento realizado durante a
20 adolescência, como pode ser observado na figura 22B a administração repetida tanto de
21 metilfenidato quanto de cafeína, durante a adolescência, não foi capaz de alterar o ganho de peso
22 corporal de ambas as linhagens durante os 14 dias de tratamento. A única diferença que pode ser
23 observada, assim como ocorreu com o tratamento na idade adulta, é a já existente entre o
24 tamanho e conseqüentemente entre o peso corporal das linhagens WIS e SHR [$F(1,42)=93.13,$

1 $P \leq 0.001$], que não sofreram alterações e também o fator repetição que também já era esperado

2 $[F(6,252)=2065.2, P \leq 0.001]$.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

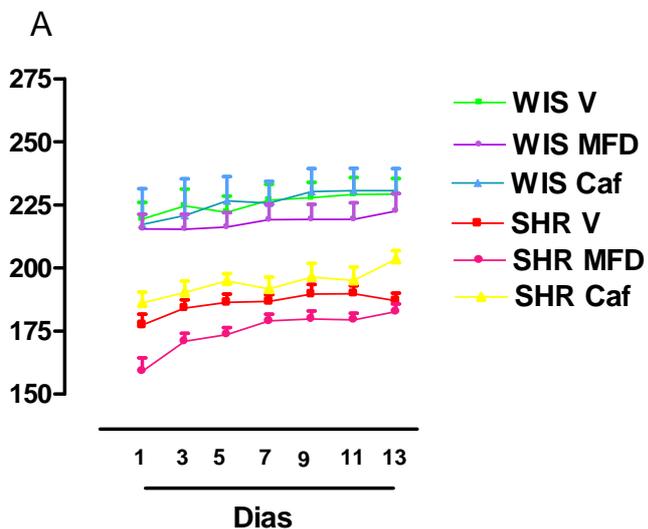
13

14

15

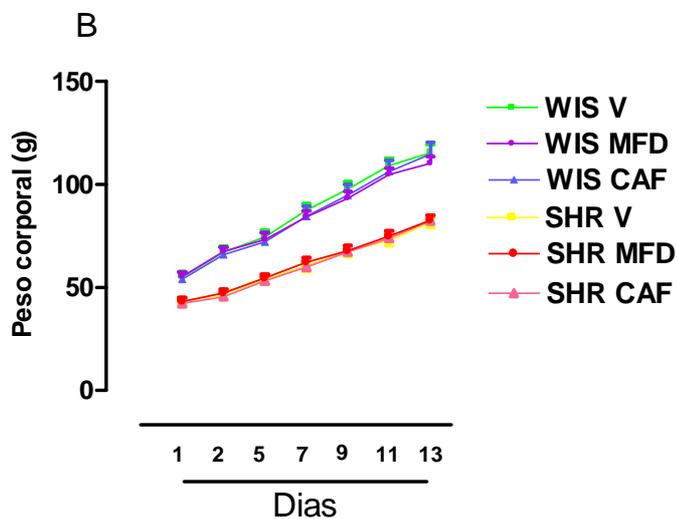
16

Fêmeas - adultas



1
2
3

Fêmeas - adolescentes



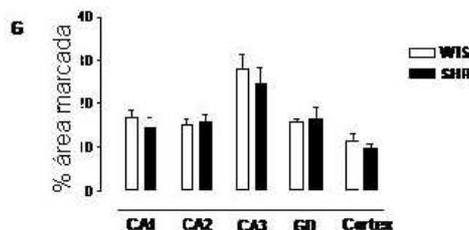
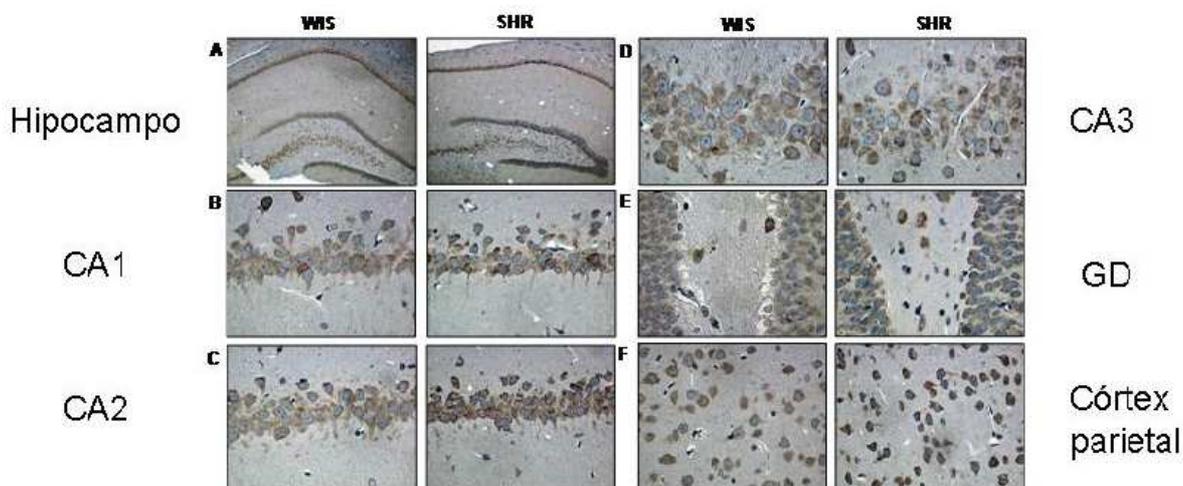
4
5
6
7
8
9
10

Figura 22 – Efeitos da administração (i.p.) repetida, durante a idade adulta (A) ou durante a adolescência (B) de veículo (V), metilfenidato (MFD) 2 mg/kg ou cafeína (CAF) 3 mg/kg, sob o ganho de peso corporal (média \pm E.P.M.), em ratos fêmeas adultos WIS e SHR.

1 **4.11. Análise imuno-histoquímica para expressão de receptores de adenosina A1 e A2A em**
2 **cérebros de ratos fêmeas adultos das linhagens WIS e SHR**

3
4
5 Para investigar se a expressão de receptores adenosinérgicos poderia estar envolvida com
6 o prejuízo cognitivo apresentado pelos ratos SHR foram realizadas análises de imuno-
7 histoquímica no hipocampo, nas sub-regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD) e no córtex
8 parietal.

9 A figura 23 demonstra a expressão de receptores de adenosina A1 no hipocampo (sub-
10 regiões CA1, CA2, CA3 e GD) e no córtex parietal de ratos fêmeas adultos WIS e SHR ambos
11 tratados com veiculo. Como pode ser observado no gráfico abaixo da figura, não ocorreu
12 diferença significativa na quantificação de receptores de adenosina A1 em nenhuma das áreas
13 analisadas entre as linhagens WIS e SHR.



1

2 **Figura 23** – Figura representativa da expressão de receptores de adenosina A1, através de
 3 análises de imuno-histoquímica, na região do hipocampo - 4X (A), sub-regiões hipocâmpais CA1
 4 - 20X(B), CA2 - 20X(C), CA3 - 20X (D) e GD – 20X (E), no córtex parietal – 20X (F) de ratos
 5 WIS e SHR.

6

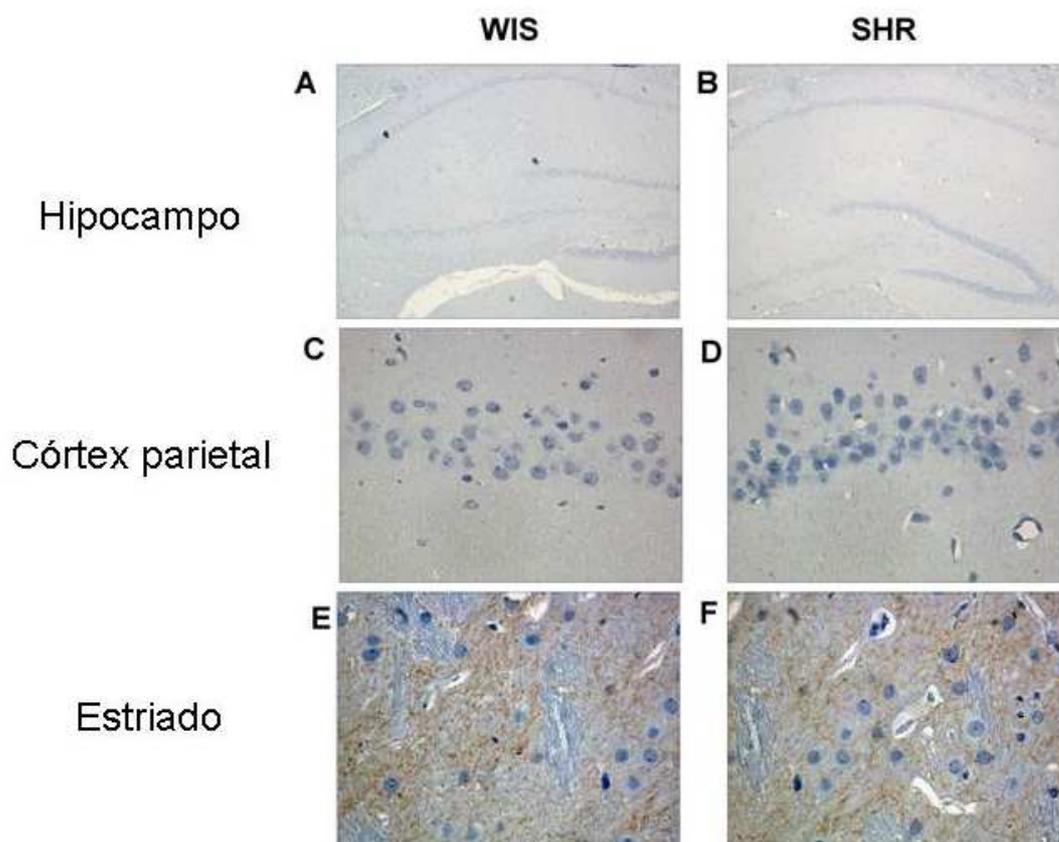
7

8

9

Na figura 24 encontra-se demonstrado a expressão de receptores de adenosina A2A no
 10 hipocampo, córtex parietal e estriado de ratos fêmeas adultos WIS e SHR também tratados com
 11 veículo. A análise de imuno-histoquímica não foi capaz de detectar a expressão de receptores de
 12 adenosina A2A nas regiões hipocâmpais analisadas e no córtex parietal de ambas as linhagens.
 13 No entanto, como pode ser observado na figura abaixo, uma pronunciada expressão desses
 14 receptores foi encontrada na região estriatal de ambas as linhagens, que foi então utilizada como
 15 controle positivo para a reação com o anticorpo para receptores de adenosina A2A.

16



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

Figura 24 – Figura representativa da expressão de receptores de adenosina A2A, através de análises de imuno-histoquímica, no hipocampo – 4X (A e B), córtex parietal – 20X(C e D) e no estriado – 40X (E e F) de ratos WIS e SHR.

1 5. DISCUSSÃO

2
3
4
5 Os resultados do presente estudo demonstram pela primeira vez que ratos SHR machos e
6 fêmeas apresentam um significativo prejuízo na habilidade de reconhecimento de objetos, com
7 sutis diferenças estruturais, quando comparados com a linhagem de ratos WIS. Observamos
8 também que esse déficit apresentado pelos ratos SHR foi eficientemente revertidos pela
9 administração aguda de metilfenidato, cafeína, de antagonistas seletivos para receptores
10 adenosinérgicos do subtipo A₁ (DPCPX), A_{2A} (ZM241385) e também pela administração da
11 associações de DPCPX e ZM241385 em doses que sozinhas não foram efetivas. Verificamos
12 ainda que os diferentes tratamentos não alteraram a atividade locomotora e o estado hipertensivo
13 dos animais, sugerindo que a melhora no prejuízo cognitivo causado pela administração das
14 drogas utilizadas não está diretamente relacionada com esses fatores. Além disso investigamos o
15 efeito da administração repetida de cafeína durante a idade adulta e durante a adolescência, e em
16 ambos os períodos a cafeína foi capaz de reverter, assim como o metilfenidato, os prejuízos
17 cognitivos apresentados por esses animais.

18 Vários estudos têm investigado a disfunção cognitiva dos ratos SHR em diferentes testes
19 comportamentais, já que esses animais apresentam os principais sintomas comportamentais
20 observados em pacientes que possuem o TDAH como hiperatividade, impulsividade e desatenção
21 (Sagvolden e Sergeant 1998; Sagvolden, 2000; Russel, 2002). Os prejuízos cognitivos
22 encontrados neste trabalho estão de acordo com estudos prévios que demonstraram menos
23 desempenho na performance dos ratos SHR quando comparados a linhagem utilizada como
24 controle (Hecht *et al.*, 1978; Sutterer *et al.*, 1980; Wyss *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 1995;
25 Nakamura-Palacios *et al.*, 1996; Gattu *et al.*, 1997; Terry *et al.*, 2000; Wyss *et al.*, 2000; De

1 Bruin *et al.*, 2003; Prediger *et al.*, 2005a,b). No entanto é importante salientar que alguns autores
2 criticam o uso desta linhagem como modelo do TDAH, já que resultados comportamentais
3 indicaram que esses animais não apresentam sintomas consistentes equivalentes aos
4 diagnosticados no TDAH, como hiperatividade e prejuízos atencionais (van den Bergh *et al.*,
5 2006; Alsop, 2007), ou ainda estudos os quais indicam que os efeitos comportamentais após
6 tratamento com metilfenidato, a droga freqüentemente mais prescrita para o tratamento do
7 TDAH, não são específicas para a linhagem SHR (Bizot *et al.*, 2007; Ferguson *et al.*, 2007).

8 O modelo de reconhecimento de objetos utilizado neste trabalho é amplamente utilizado
9 como um teste de memória de trabalho, este modelo embora de simples execução é bastante útil
10 para investigar processos de atenção, aprendizado e ainda diferentes etapas da memória. Ele
11 utiliza como principal ferramenta a tendência natural que os roedores possuem de investigar
12 aquilo que é novo, e requer a habilidade de discriminação entre o objeto familiar e o não familiar.
13 Prediger *et al.* (2005a) demonstraram que os ratos SHR, os quais apresentam déficits de atenção
14 em paradigmas clássicos para a avaliação de processos atencionais, são capazes de discriminar
15 objetos com grandes diferenças estruturais. No entanto, no presente estudo, utilizamos uma
16 versão modificada do teste de reconhecimento de objetos, onde os animais foram submetidos a
17 objetos com diferentes níveis de complexidade estruturais, onde foi possível observar que ratos
18 machos e fêmeas adultos da linhagem SHR são capazes de discriminar objetos com claras
19 diferenças estruturais (ex: cubo X pirâmide), no entanto não possuem a mesma habilidade quando
20 os objetos são bem semelhantes (ex: cubo X “T”) quando comparados aos ratos WIS. Este déficit
21 na capacidade discriminatória não pode ser explicado pela diminuição do interesse dos animais
22 por novidades ou anedonia, já que durante a fase de apresentação aos objetos, onde os dois
23 objetos eram novos, os ratos SHR apresentaram tempo de investigação semelhante aos ratos WIS
24 e também não podem ser explicados por prejuízo na formação da memória, já que os animais

1 foram capazes de discriminar os objetos quando esses não eram tão semelhantes. As
2 modificações realizadas nesta versão nos permitiram então avaliar também processos atencionais,
3 já que os objetos são bastante semelhantes e a capacidade de manter a atenção sustentada é
4 imprescindível para que os animais possam discriminá-los, podendo ser que um prejuízo neste
5 processo seja o responsável pelo déficit na capacidade discriminatória apresentada pelos ratos
6 SHR.

7 Considerando a redução na performance dos ratos SHR em diferentes paradigmas de
8 avaliação de aprendizado e memória, eles têm sido considerados um modelo interessante para
9 investigação de substâncias com potencial terapêutico para transtornos de memória e atenção
10 (Meneses e Hong, 1998). Com o intuito de validar o uso da linhagem de ratos SHR no modelo
11 utilizado, assim como pode ser observado em nossos resultados, realizamos o tratamento com
12 metilfenidato em todas as etapas da pesquisa. Além da validação, o uso do metilfenidato teve
13 como objetivo a investigação de sua ação em ratos SHR, quando submetidos a testes cognitivos,
14 já que são poucos os trabalhos que abordam o uso desta droga em ratos SHR para avaliação
15 desses prejuízos. Como pode ser observado, a administração aguda de 2 mg/kg de metilfenidato
16 antes da etapa de apresentação aos objetos, ou a administração repetida da mesma dose tanto
17 durante a idade adulta, quanto na adolescência, foi capaz de reverter o prejuízo na capacidade
18 discriminatória apresentada por esses animais (Ueno *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2002; Adriani *et al.*,
19 2004). Neste trabalho não foi investigada qual é a persistência do efeito desta droga quando
20 administrada de forma repetida durante a idade adulta, no entanto, ao tentar simular o tratamento
21 que ocorre na clínica, administramos metilfenidato de forma repetida durante 14 dias no início da
22 adolescência e como pode ser observado os efeitos foram persistentes podendo ser detectados 2
23 meses após o término do tratamento, tanto em ratos WIS como em ratos SHR.

1 O mecanismo exato responsável pelos déficits cognitivos apresentados pelos ratos SHR
2 ainda é desconhecido, no entanto a hipótese mais aceita é a existência de um distúrbio na
3 neurotransmissão dopaminérgica (Russel *et al.*, 1998; Papa *et al.*, 2002; Russel, 2002) assim
4 como observado no TDAH. Além disso, vários trabalhos tem demonstrado alterações funcionais
5 na neurotransmissão adenosinérgica em ratos SHR (Kamikawa *et al.*, 1980; Davies *et al.*, 1987,
6 Illes *et al.*, 1989, Matias *et al.*, 1993). O fato dos ratos SHR apresentarem redução na atividade da
7 enzima adenosina deaminase, que é responsável pela metabolização da adenosina em inosina,
8 causa um conseqüente aumento na atividade do sistema adenosinérgico, que pode ser
9 parcialmente responsável pela disfunção nos processos cognitivos, desde que evidências
10 suportam o efeito negativo de agonistas de receptores de adenosina no aprendizado e na memória
11 de roedores (Normile e Barraco, 1991; Zarrindast e Shafaghi, 1994; Ohno e Watanabe, 1996;
12 Homayoun *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2008). Takahashi *et al.*, (2008) revisaram recentemente
13 estudos psicofarmacológicos pré-clínicos, os quais indicavam que a cafeína e antagonistas
14 seletivos para receptores de adenosina podem melhorar a memória de roedores assim como
15 proporcionar efeito protetor nas disfunções de memória apresentado em modelos animais da
16 doença de Alzheimer, Parkinson e TDAH.

17 No presente estudo, a administração aguda com cafeína na dose de 10 mg/kg em machos e
18 nas doses de 1, 3 ou 10 mg/kg em fêmeas, antes da fase de apresentação aos objetos, melhorou
19 significativamente o índice de reconhecimento apresentados pelos ratos SHR quando objetos com
20 diferenças estruturais sutis foram apresentados (cubo X T). A cafeína foi capaz de promover um
21 significativo aumento no tempo de investigação do novo objeto na fase de discriminação sem
22 alterar o tempo de investigar do par de objetos iguais durante a fase de apresentação aos objetos.
23 Esses resultados não podem ser explicados pelo aumento na atividade locomotora, desde que não

1 foi observado alteração no número total de cruzamentos no campo aberto, durante a realização
2 das fases de apresentação e de reconhecimento dos objetos.

3 Assim como em estudos anteriores que demonstraram que a administração de cafeína
4 antes da sessão de treinamento é ineficaz, ou pode até mesmo prejudicar a retenção da memória
5 em roedores (Izquierdo *et al.*, 1979; Angelucci *et al.*, 1999, 2002; Prediger *et al.*, 2005a, b), no
6 presente estudo a administração de cafeína, nas doses utilizadas, não causou nenhum tipo de
7 efeito quando administrado agudamente em ratos WIS ou quando administrado de forma repetida
8 (14 dias) durante a idade adulta. Por outro lado, quando administrados de forma repetida durante
9 a adolescência e testados na idade adulta a cafeína assim como o metilfenidato causaram um
10 prejuízo na habilidade discriminatória destes animais. Este efeito provavelmente ocorreu devido a
11 um desequilíbrio em processos de neurotransmissão, já que a fase onde ocorreu o tratamento é
12 uma fase onde várias modificações e processos de maturações neuronais estão ocorrendo e a
13 exposição prolongada a psicoestimulantes nesta fase podem causar modificações e adaptações
14 permanentes, resultando em disfunções no funcionamento cerebral durante a idade adulta
15 (Andersen, 2003; Stanwood e Levitt, 2004). Estudos demonstram que quando os níveis de
16 catecolaminas estão normais, a administração repetida de metilfenidato induz perturbações que
17 podem causar adaptações neuronais, podendo assim prejudicar o eficiente funcionamento
18 cognitivo. Heyser, Pelletier e Ferris (2004) encontraram prejuízos na memória de reconhecimento
19 de animais jovens que foram tratados (i.p.) com metilfenidato (5 mg/kg), duas vezes ao dia,
20 durante sete dias. Já outro estudo demonstrou que a administração de metilfenidato nas doses de
21 3 e 5 mg/kg durante 21 dias causou prejuízo na tarefa de reconhecimento de objetos quando
22 testados 14, 28 ou 42 dias após a última administração de metilfenidato (LeBlanc-Duchin e
23 Taukulis, 2007). Resultados semelhantes foram observados neste mesmo teste quando ratos

1 machos foram tratados cronicamente com d-anfetamina e testados 7 dias depois (Bisagno *et al.*,
2 2003).

3 Possivelmente, a explicação para esses resultados, é que a dificuldade apresentada pelos
4 ratos SHR na discriminação entre o objeto novo e o familiar ocorre devido a um prejuízo na
5 aquisição de informações durante a fase onde os objetos são apresentados a esses animais pela
6 primeira vez, que pode ser consequência da impulsividade ou da dificuldade de manter uma
7 atenção sustentada. Assim, a administração de cafeína, conhecida por melhorar a atenção (Nehlig
8 *et al.*, 1992), teria permitido a melhora e a sustentação da atenção no momento da apresentação
9 aos objetos e, conseqüentemente, facilitado o reconhecimento do mesmo durante a fase de
10 reconhecimento. Este efeito ficou evidente quando administramos a cafeína antes da etapa de
11 apresentação aos objetos, e realizamos a fase de reconhecimento 24 horas após, esse experimento
12 nos permitiu verificar que o efeito da droga estava realmente ocorrendo na etapa de aquisição das
13 informações, pois na etapa de evocação os animais já não estavam sobre o efeito da droga.
14 Através destes mesmos resultados foi também possível excluir a existência de um efeito
15 dependente de estado, já que os ratos SHR demonstraram melhora na habilidade discriminatória
16 mesmo sem estar sob o efeito das drogas (Corodimas *et al.*, 2000).

17 Observamos também que a capacidade da cafeína de melhorar o prejuízo na capacidade
18 de discriminação desses animais parece ser mediada tanto via receptores A_1 quanto via receptores
19 A_{2A} , já que resultados similares aos da cafeína foram obtidos com a administração aguda do
20 antagonista seletivos para receptores adenosinérgicos do subtipo A_1 – DPCPX e também pela
21 administração aguda do antagonista adenosinérgico seletivos para receptores do subtipo A_{2A} -
22 ZM24138, observamos ainda que doses desses mesmos antagonistas que eram ineficazes quando
23 administradas isoladamente, foram capazes de reverter o prejuízo dos ratos SHR quando
24 associadas.

1 Existe uma grande controvérsia a respeito da participação de receptores A1 e A2A em
2 processos de aprendizado e memória. Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório
3 demonstraram que o ZM241385, assim como a cafeína, foram capazes de reverter o prejuízo
4 apresentado pelos SHR na tarefa de reconhecimento social, utilizado para avaliar memória de
5 trabalho, (Prediger *et al.*, 2005a). Já quando avaliado o efeito da cafeína no teste de memória
6 espacial no labirinto aquático de Morris (Prediger *et al.*, 2005b), assim como nos nossos
7 experimentos, tanto a administração de DPCPX quanto a administração de ZM241385 foram
8 capazes de reverter, assim como a cafeína, o prejuízo apresentado pelos ratos SHR (Takahashi *et*
9 *al.*, 2008).

10 Apesar de não existir um consenso a respeito de qual seria o principal receptor envolvido,
11 evidências sugerem que o efeito da cafeína ocorre principalmente via receptores A_{2A}. Higgins *et*
12 *al.*, (2007) demonstraram recentemente que o efeito da cafeína no aumento do tempo de reação
13 durante a realização do teste de atenção “*five-choice*” é mediado pelo antagonismo de receptores
14 de adenosina do subtipo A_{2A}. Outro trabalho realizado por Gimenez-Llort *et al.*, (2007), onde
15 foram utilizados ratos transgênicos que super-expressam receptores adenosinérgicos humanos do
16 subtipo A_{2A}, demonstrou que esses animais apresentam déficits na memória de trabalho quando
17 avaliados no teste de reconhecimento de objetos. Juntos esses trabalhos reforçam nossa hipótese
18 de que um possível desequilíbrio no sistema adenosinérgico pode ser o responsável, pelo menos
19 em parte, pelo déficit atencional apresentado pelos ratos SHR, e que a reversão deste
20 desequilíbrio pela cafeína (através do bloqueio de receptores de adenosina) seja responsável pelo
21 efeito positivo no desempenho dos ratos SHR no teste de reconhecimento de objetos.

22 A memória de trabalho é um relevante processo cognitivo para aquisição de informações
23 importantes e idéias que são críticas para argumentação e para o julgamento humano. Castner *et*
24 *al.* (2004) através de sua revisão, demonstraram que a memória de trabalho depende da

1 integridade funcional do córtex pré-frontal, embora o hipocampo, córtex parietal inferior, núcleo
2 caudado e núcleo dorsomedial do tálamo são áreas cerebrais conhecidas por apresentarem papel
3 relevante no circuito neural. Baseado no estudo de Gimenez-llort *et al.* (2007), onde evidências
4 demonstraram que déficits na memória de trabalho em ratos podem ser consequência de uma
5 expressão aumentada de receptores de adenosina A_{2A} na região do córtex cerebral e do
6 hipocampo, foi avaliado no presente estudo a comparação da expressão de receptores de
7 adenosina A₁ e A_{2A} na região cortical e hipocampal de ratos WIS e SHR através da técnica de
8 imuno-histoquímica. Entretanto, surpreendentemente não foram encontradas diferenças
9 significativas nos níveis de receptores de adenosina A₁ e A_{2A} entre as linhagens avaliadas.
10 Embora inéditos esses resultados estão de acordo com a já sabida escassez de receptores A_{2A} em
11 algumas áreas cerebrais no SNC de roedores, sendo encontrados principalmente no estriado,
12 núcleo acumbens e tubérculo olfatório (Fredholm *et al.*, 1998; Rosin *et al.*, 1998, 2003).

13 Outra possível especulação para os resultados encontrados no presente estudo é a
14 interação entre receptores de adenosina e de dopamina. Vários trabalhos demonstraram
15 evidências da existência de formação de complexos heterodímeros entre os receptores A₁- D₁ e
16 entre os receptores A₂ – D₂. A formação destes complexos pode causar modificações na
17 neurotransmissão da dopamina, influenciando tanto as condições fisiológicas quando patológicas
18 envolvidas. Estudos farmacológicos demonstraram que a neuromodulação adenosinérgica causa
19 profundo efeito na função neuronal da dopamina (Fuxe *et al.*, 1998; Hillion *et al.*, 2002; Canals *et*
20 *al.*, 2003; Kamiya *et al.*, 2003, Fuxe *et al.*, 2007). Os efeitos comportamentais observados neste
21 estudo, através da administração de antagonistas adenosinérgicos, podem estar relacionados com
22 a existência desses complexos heterodímeros, desde que os efeitos encontrados com a
23 administração desses antagonistas foram bastante semelhantes aos encontrados com

1 metilfenidato, uma droga que tem como principal mecanismo de ação a inibição da recaptação de
2 dopamina causando assim um aumento na concentração da mesma na fenda sináptica.

3 Outro ponto que deve ser discutido é a possibilidade de algum tipo de relação entre os
4 déficits cognitivos e a hipertensão apresentados pelos SHR. A ativação de receptores de
5 adenosina demonstrou diminuir a pressão sanguínea, enquanto seu bloqueio demonstrou causar
6 hipertensão (Azevedo e Osswald, 1992; Biaggioni, 1992; Abdel-Rahman e Tao, 1996). No
7 entanto, nossos resultados indicaram que apesar das maiores doses de DPCPX terem causado
8 uma diminuição na pressão arterial dos ratos SHR, a reversão dos processos cognitivos
9 encontrados não parecem estar relacionados com a diminuição da pressão arterial, já que as doses
10 utilizadas de metilfenidato, cafeína e ZM241385, que foram capazes de melhorar a função
11 cognitiva dos ratos SHR, não foram capazes de alterar o estado hipertensivo desses animais.
12 Assim como em nossas evidências, estudos prévios que também demonstraram melhora no
13 aprendizado de ratos SHR, não encontraram nenhuma interferência nos valores da pressão arterial
14 desses animais (De Bruin *et al.*, 2003; Prediger *et al.*, 2005a, b), sugerindo assim que outros
15 fatores, mas não a hipertensão estão diretamente relacionados com os déficits cognitivos
16 apresentados.

17 Em conclusão, o presente estudo caracteriza pela primeira vez a presença de prejuízos
18 cognitivos, no teste de reconhecimento de objetos, em ratos SHR machos e fêmeas adultos,
19 possivelmente devido a dificuldade de manter a atenção sustentada durante o teste. Demonstram
20 ainda que o déficit apresentado por esses animais foram revertidos pela administração aguda de
21 metilfenidato e de cafeína, de maneira semelhante em ambos os sexos. Através da administração
22 de antagonistas adenosinérgicos seletivos, observamos que o efeito encontrado com a cafeína
23 pode estar relacionado tanto com o bloqueio de receptores A1 como A2A. Encontramos ainda
24 que a administração repetida de metilfenidato ou de cafeína possivelmente são responsáveis por

1 modificações persistentes em processos neuronais. É interessante ressaltar também que
2 possivelmente os prejuízos apresentados pelos ratos SHR não estão relacionados com a
3 hipertensão e que outros estudos são necessários para esclarecer se os resultados encontrados
4 estão relacionados com alterações na expressão de receptores de adenosina A₁ ou A_{2A}.
5 Certamente mais estudos são necessários também para avaliar o mecanismo pelo qual esses
6 efeitos estão sendo realizados, a durabilidade dos efeitos e a existência da interação entre o
7 sistema adenosinérgico e outros sistemas de neurotransmissores que podem estar também
8 envolvidos com o efeito da cafeína. E ainda deixar claro a importância da descoberta e
9 desenvolvimento de uma alternativa terapêutica para o tratamento do TDAH, já que o diagnóstico
10 desde distúrbio está sendo realizado cada vez mais cedo, sendo que muitas vezes é realizado de
11 forma errônea, colocando em risco o desenvolvimento e saúde mental de milhares de crianças e
12 adolescentes que são desde cedo submetidos ao uso crônico de psicoestimulantes.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman, A.A., Tao, S., 1996. Differential alteration of neuronal and cardiovascular responses to adenosine microinjected into the nucleus tractus solitarius of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension** 27, 939-948.
- Adriani, W., Laviola, G., 2004. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. **Behav Pharmacol** 15, 341-352.
- Andersen, S.L., Arvanitogiannis, A., Pliakas, A.M., LeBlanc, C., Carlezon, W.A., 2001. Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. **Nature Neuroscience** 5 (1), 13-14.
- Andersen, S.L., 2003. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? **Neurosci Biobehav Rev** 27(1-2), 3-18.
- Arnsten, A.F., Li, B.M., 2005. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. **Biol Psychiatry** 1;57(11), 1377-84.
- Alsop, B., 2007. Problems with spontaneously hypertensive rats (SHR) as a model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **J Neurosci Methods** 162, 42-48.
- Angelucci, M.E., Cesario, C., Hiroi, R.H., Rosalen, P.L., Da Cunha, C., 2002. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. **Braz J Med Biol Res** 35, 1201-1208.
- Angelucci, M.E., Vital, M.A., Cesário, C., Zadusky, C.R., Rosalen, P.L., Da Cunha, C., 1999. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **Eur J Pharmacol** 373, 135-140.
- Azevedo, I., Osswald, W., 1992. Does adenosine malfunction play a role in hypertension? **Pharmacol Res** 25, 227-236.
- Barrickman, L., Noyes, R., Kuperman, S., Schumacher, E., Verda, M., 1991. Treatment of ADHD with fluoxetine: a preliminary trial. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry** 30, 762-767.
- Besheer, J., Bevins, R.A., 2000. The role of environmental familiarization in novel-object preference. **Behav Processes** 7;50(1), 19-29.
- Bevins, R.A., Besheer, J., 2006. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. **Nat Protoc** 1(3):1306-11.

- 1 Biaggioni, I., 1992. Contrasting excitatory and inhibitory effects of adenosine in blood pressure
2 regulation. **Hypertension** 20, 457-465.
3
- 4 Biederman, J., Spencer, T., 1999. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a
5 noradrenergic disorder. **Biol. Psychiatry** 46, 1234-1242.
6
- 7 Biederman, J., Faraone, S.V., Spencer, T., Wilens, T., Mick, E., Lapey, K.A., 1994. Gender
8 differences in sample of adults with attention deficit hyperactivity disorder. **Psychiatry Res** 53,
9 13-29.
10
- 11 Bizzarro, L., Patel, S., Murtagh, C., Stolerman, I. P., 2004. Differential effects of psychomotor
12 stimulants on attentional performance in rats: nicotine, amphetamine, caffeine and
13 methylphenidate. **Behav Pharmacol** 15(3), 195-206.
14
- 15 Bizot, J.C., Chenault, N., Houzé, B., Herpin, A., David, S., Pothion, S., Trovero, F., 2007.
16 Methylphenidate reduces impulsive behaviour in juvenile Wistar rats, but not in adult Wistar,
17 SHR and WKY rats. **Psychopharmacology** 193, 215-223.
18
- 19 Boix, F., Qiao, S., Kolpus, T., Sagvolden, T., 1998. Chronic -deprenyl treatment alters brain
20 monoamine levels and reduces impulsiveness in an animal model of Attention-
21 Deficit/Hyperactivity Disorder. **Behav. Brain Res** 94, 153-162.
22
- 23 Borstel, R. W., 1983. Bioloal effects of caffeine. **Metabolism. Food Technol** 40-47.
24
- 25 Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S.R., Neve, K.,
26 Fuxe, K., Agnati, L.F., Woods, A.S., Ferre, S., Lluís, C., Bouvier, M., 2003. Adenosine A2A-
27 dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by
28 fluorescence and bioluminescence energy transfer. **J Biol Chem** 278, 46741-46749.
29
- 30 Castner, S.A., Goldman-Rakic, P.S., Williams, G.V., 2004. Animal models of working memory:
31 insights for targeting cognitive dysfunction in schizophrenia. **Psychopharmacology** 174, 111-
32 125.
33
- 34 Clements, K.M., Wainwright, P.E., 2006. Spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and
35 Sprague-Dawley rats differ in performance on a win-shift task in the water radial arm maze.
36 **Behav Brain Res** 28;167(2), 295-304.
37
- 38 Corodimas, K.P., Pruitt, J.C., Stieg, J.M., 2000. Acute exposure to caffeine selectively disrupts
39 context conditioning in rats. **Psychopharmacology (Berl)** 152(4), 376-82.
40
- 41 Cunha, R.A., 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous
42 system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem Int** 38, 107-125.
43
- 44 Davids, E., Zhang, K., Tarazi, F.I., Baldessarini, R.J., 2003. Animal models of attention-deficit
45 hyperactivity disorder. **Brain Res Brain Res Rev** 42, 1-21.
46

- 1 Davies, L.P., Hambley, J.W., Johnston, G.A.R., 1987. Reduced adenosine deaminase activity in
2 the CNS of spontaneously hypertensive rats. **Neurochem Int** 10, 533–536.
3
- 4 De Bruin, N.M.W.J., Kiliaan, A.J., De Wilde, M.C., Broersen, L.M., 2003. Combined uridine and
5 choline administration improves cognitive deficits in spontaneously hypertensive rats. **Neurobiol**
6 **Learn Mem** 80, 63–79.
7
- 8 de Mendonça, A., Almeida, T., Bashir, Z.I., Ribeiro, J.A., 1997. Endogenous adenosine
9 attenuates long-term depression and depotentiation in the CA1 region of the rat hippocampus.
10 **Neuropharmacology** 36, 161–167.
11
- 12 de Mendonça, A., Ribeiro, J.A., 1994. Endogenous adenosine modulates long-term potentiation
13 in the hippocampus. **Neuroscience** 62, 385–390.
14
- 15 Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in
16 rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res** 31, 47-59.
17
- 18 Faraone, S.V., 1998. Biederman J. Neurobiology of attention-deficit/ hyperactivit disorder. **Biol**
19 **Psychiatry** 44, 951-8.
20
- 21 Ferguson, A.S., Cada, A.M., 2004. Spatial learning/memory and social and nonsocial behaviors
22 in the spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rat strains. **Pharmacol**
23 **Biochem Behav** 77, 583-594.
24
- 25 Ferguson, S.A., Paule, M.G., Cada, A., Fogle, C.M., Gray, E.P., Berry, K.J., 2007. Baseline
26 behavior, but not sensitivity to stimulant drugs, differs among Spontaneously Hypertensive,
27 Wistar-Kyoto, and Sprague-Dawley rat strains. **Neurotoxicol Teratol** 29, 547-561.
28
- 29 Ferré, S., Fuxe, K., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B., 1992. Adenosine-dopamine
30 interactions in the brain. **Neuroscience** 51(3):501-12.
- 31 Fox, G.B., Pan, J.B., Esbenshade, T.A., Bennani, Y.L., Black, L.A., Faghieh, R., Hancock, A.A.,
32 Decker, M.W., 2002. Effects of histamine H(3) receptor ligands GT-2331 and ciproxifan in a
33 repeated acquisition avoidance response in the spontaneously hypertensive rat pup. **Behav Brain**
34 **Res** 131, 151-161.
- 35 Franco, R., Ferre, S., Agnati, L., Torvinen, M., Gines, S., Hillion, J., Casado, V., Lledo, P., Zoli,
36 M., Lluís, C., Fuxe, K., 2000. Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications
37 for heteromerization. **Neuropsychopharmacology** 23, S50–S59.
38
- 39 Franco, R., Lluís, C., Canela, E.I., Mallol, J., Agnati, L., Casado, V., Ciruela, F., Ferre, S., Fuxe,
40 K., 2007. Receptor-receptor interactions involving adenosine A1 or dopamine D1 receptors and
41 accessory proteins. **J Neural Transm** 114, 93-104.
42
- 43 Fredholm, B. B., Battig, K., Holmén, J., Hehlig, A., Zvartau, E. E., 1999. Actions of caffeine in
44 the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological**
45 **Reviews** V. 51, n.1, 83-133

- 1 Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J., 2001. International
2 Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors.
3 **Pharmacol Rev** 53, 527–552.
4
- 5 Fredholm, B.B., Svenningsson, P., 1998. Striatal adenosine A2A receptors-where are they? What
6 do they do? **Trends Pharmacol Sci** 19, 46-48.
7
- 8 Fuxe, K., Ferre, S., Genedani, S., Rafael, F., Agnati, L., 2007. Adenosine receptor-dopamine
9 receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. **Physiol Behav**
10 92, 210–217.
11
- 12 Fuxe, K., Ferre, S., Zoli, M., Agnati, L.F., 1998. Integrated events in central dopamine
13 transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine
14 A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia.
15 **Brain Res Brain Res Rev** 26, 258–273.
16
- 17 Gatlev, S. J., Pan, D., Chen, R., Chaturvedi, G., Ding, Y. S., 1996. Affinities of methylphenidate
18 derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transportes. **Life Sci** 58(12), 231-9.
19
- 20 Gattu, M., Pauly, J.R., Boss, K.L., Summers, J.B., Buccafusco, J.J., 1997. Cognitive impairment
21 in spontaneously hypertensive rats: role of central nicotinic receptors. **Brain Res** 771, 89-103.
22
- 23 Gimenez-Llort, L., Schiffmann, S.N., Shmidt, T., Canela, L., Camon, L., Wassholm, M., Canals,
24 M., Terasmaa, A., Fernandez-Teruel, A., Tobena, A., Popova, E., Ferre, S., Agnati, L., Ciruela,
25 F., Martinez, E., Scheel-Kruger, J., Lluís, C., Franco, R., Fuxe, K., Bades, M., 2007. Working
26 memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine human adenosine A2A
27 receptors in the brain. **Neurobiol Learn Mem** 87, 42-56.
28
- 29 Giros, B., Jaber, M., Jones, S.R., Wightman, R.M., Caron, M.G., 1996. Hyperlocomotion and
30 indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature** 379,
31 606-612.
32
- 33 Gray, J.D., Punsoni, M., Tabori, N.E., Melton, J.T., Fanslow, V., Ward, M.J., Zupan, B., Menzer,
34 D., Rice, J., Drake, C.T., Romeo, R.D., Brake, W.G., Torres-Reveron, A., Milner, T.A., 2007.
35 Methylphenidate administration to juvenile rats alters brain areas involved in cognition,
36 motivated behaviors, appetite, and stress. **J Neurosci** 4;27(27):7196-207.
37
- 38 Grauer, E., Kapon, Y., 1993. Wistar-Kyoto rats in the Morris water maze: impaired working
39 memory and hyper-reactivity to stress. **Behav Brain Res** 31;59(1-2), 147-51.
40
- 41 Goldman, L. S., Genel, M., Bezman, R. J., Slanetz, P. J., 1998. Diagnosis and treatment of
42 attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs,
43 American Medical Association. **Jama** 8;279(14), 1100-7.
44
- 45 Hamelers, P.A., Van Boxtel, M.P., Hogervorst, E., Riedel, W.J., Houx, P.J., Buntinx, F., Jolles,
46 J., 2000. Habitual caffeine consumption and its relation to memory, attention, planning capacity
47 and psychomotor performance across multiple age groups. **Hum Psychopharmacol** 15, 573-581.

- 1 Haskell, C.F., Kennedy, D.O., Wesness, K.A., Scholey, A.B., 2005. Cognitive and mood
2 improvements of caffeine in habitual consumers and habitual non-consumers of caffeine.
3 **Psychopharmacology** 179, 813-825.
4
- 5 Hecht, K., Poppei, M., Hecht, T., Postnow, J.W., Moritz, V., Baumann, R., 1978. Learning and
6 memory processes during postnatal ontogenesis in rats with spontaneous hypertension. **Acta Biol**
7 **Med Ger** 37, 1471-1478.
8
- 9 Heyser, C.J., Pelletier, M., Ferris, J.S., 2004. The effects of methylphenidate on novel object
10 exploration in weanling and periadolescent rats. **Ann N Y Acad Sci** Jun;1021, 465-9
11
- 12 Higgins, G.A., Grzelak, M.E., Pond, A.J., Cohen-Williams, M.E., Hodgson, R.A., Varty, G.B.,
13 2007. The effect of caffeine to increase reaction time in the rat during a test of attention is
14 mediated through antagonism of adenosine A(2A) receptors. **Behav Brain Res** 185, 32-42.
15
- 16 Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hanson, A., Watson,
17 S., Olah, M.E., Mallol, J., Canela, E.I., Zoli, M., Agnati, L.F., Ibanez, C.F., Lluís, C., Franco, R.,
18 Ferre, S., Fuxe, K., 2002. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine
19 A2A receptors and dopamine D2 receptors. **J Biol Chem** 277, 18091–18097.
20
- 21 Himelstein, J., Newcorn, J.H., Halperin, J.M., 2000. The neurobiology of attention-deficit
22 hyperactivity disorder. **Front Biosci** 5, D461–D478.
23
- 24 Holene, E., Nafstad, I., Skaare, J.U., Sagvolden, T., 1998. Behavioural hyperactivity in rats
25 following postnatal exposure to sub-toxic doses of polychlorinated biphenyl congeners 153 and
26 126. **Behav Brain Res** 94, 213- 224.
27
- 28 Homayoun, H., Khavandgar, S., Zarrindast, M.R., 2001. Effects of adenosine receptor agonists
29 and antagonists on pentylentetrazole-induced amnesia. **Eur J Pharmacol** 430, 289–294.
30
- 31 Huang, Z.L., Qu, W.M., Eguchi, N., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Fredholm, B.B., Urade, Y.,
32 Hayaishi, O., 2005. Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effects of caffeine.
33 **Nature Neurosci** 8(7):858-9.
34
- 35 Illes, P., Rickmann, H., Brod, I., Bucher, B., Stoclet, J.C., 1989. Subsensitivity of presynaptic
36 adenosine A1-receptors in caudal arteries of spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol**
37 174, 237–251.
38
- 39 Izquierdo, J.A., Costas, S.M., Justel, E.A., Rabiller, G., 1979. Effects of caffeine on the memory
40 of the mouse. **Psychopharmacology** 61, 29-30.
41
- 42 Jucaite, A., Fernell, E., Halldin, C., Forsberg, H., Farde, L., 2005. Reduced midbrain dopamine
43 transporter binding in male adolescents with attention deficit/ hyperactivity disorder: association
44 between striatal dopamine markers and motor hyperactivity. **Biol. Psychiatry** 57, 229-38.
45
- 46 Kamikawa, Y., Cline Jr., W.H., Su, C., 1980. Diminished purinergic modulation of the vascular
47 adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol** 66, 347–353.

- 1
2 Kamiya, T., Saitoh, O., Yoshioka, K., Nakata, H., 2003. Oligomerization of adenosine A2A and
3 dopamine D2 receptors in living cells. **Biochem Biophys Res Commun** 306, 544–549.
4
5 Kenemans, J. L., Verbaten, M. N., 1998. Caffeine and visuo-spatial attention.
6 **Psychopharmacology (Berl)** 135(4), 353-60.
7
8 Krause, K.H., Dresel, S.H., Krause, J., la Fougere, C., Ackenheil, M., 2003. The dopamine
9 transporter and neuroimaging in attention deficit hyperactivity disorder. **Neurosci. Biobehav.**
10 **Rev.** 27, 605-613.
11
12 Kuczenski, R., Segal, D. S., 2001. Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of
13 amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine. **J Pharmacol**
14 **Exp Ther** 296(3), 876-83.
15
16 LeBlanc-Duchin, D., Taukulis, H. K., 2007. Chronic oral methylphenidate administration to
17 periadolescent rats yields prolonged impairment of memory for objects. **Neurobiol Learn Mem**
18 88(3), 312-20.
19
20 Levy, F., Barr, C., Sunohara, G., 1998. Directions of aetiologic research on attention
21 deficit/hyperactivity disorder. **Aust N Z J Psychiatry** 32, 97-103.

22 Linden, J., 2001. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of
23 tissue protection. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 41, 775-787.

24 Matias, A., Zimmer, F.J., Lorenzen, A., Keil, R., Schwabe, U., 1993. Affinity of central
25 adenosine A1 receptors is decreased in spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol** 244,
26 223–230.
27
28 Meneses, A., Hong, E., 1998. Spontaneously hypertensive rats: a potential model to identify
29 drugs for treatment of learning disorders. **Hypertension** 31, 968–972.
30
31 Mick, E., Biederman, J., Faraone, S., Sayer, J., Kleiman, S., 2002. Casecontrol study of ADHD
32 and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. **J Am Acad Child Adolesc**
33 **Psychiatry** 41, 378-85.
34
35 Mori, S., Kato, M., Fujishima, M., 1995. Impaired maze learning and cerebral glucose utilization
36 in aged hypertensive rats. **Hypertension** 25, 545-553.
37
38 Moser, M.B., Moser, E.I., Wultz, B., Sagvolden, T., 1988. Component analysis differentiate
39 between exploratory behaviour of spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats in a
40 two-compartment free-exploration open field.
41 **Scand. J. Psychol** 29, 200–206.
42
43 Muglia, P., Jain, U., Macciardi, F., Kennedy, J.L., 2000. Adult attention hyperactivity disorder
44 and the dopamine D4 receptor gene. **Am J Med Genet** 96, 273-277.
45

- 1 Nakamura-Palacios, E.M., Caldas, C.K., Fiorini A., Chagas, K.D., Chagas, K.N., Vasquez, E.C.,
2 1996. Deficits of spatial learning and working memory in spontaneously hypertensive rats.
3 **Behav Brain Res** 74, 217-227.
4
- 5 Nehlig, A., Daval, J.L., Debry, G., 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of
6 action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. **Brain Res Brain Res Rev** 17, 139–
7 170.
8
- 9 Norman, G., Eacott, M.J., 2004. Impaired object recognition with increasing levels of feature
10 ambiguity in rats with perirhinal cortex lesions. **Behav Brain Res** 148, 79-91.
11
- 12 Normile, H.J., Barracom, R.A., 1991. N6-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance
13 retention by selective action at A1 receptors. **Brain Res Bull** 27, 101–104.
14
- 15 Ohno, M., Watanabe, S., 1996. Working memory failure by stimulation of hippocampal
16 adenosine A1 receptors in rats. **Neuroreport** 25, 3013–3016.
17
- 18 Okamoto, K., Aoki, K., 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn.**
19 **Circ. J.** 27, 282-293.
20
- 21 Olfson, M., Marcus, S.C., Weissman, M.M., Jensen, P.S., 2002. National trends in the use of
22 psychotropic medications by children. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 41(5), 514-21.
23
- 24 Papa, M., Diewald, L., Carey, M.P., Esposito, F.J., Girondi Carnevale, U.A., Sadile, A.G., 2002.
25 A rostro-caudal dissociation in the dorsal and ventral striatum of the juvenile SHR suggests an
26 anterior hypo- and posterior hyperfunctioning mesocorticolimbic system. **Behav Brain Res** 130,
27 171–179.
- 28 Petry, A., 1999. Hiperatividade: Características e procedimentos básicos para amenizar as
29 dificuldades. Professor, Porto Alegre. Abril, p.47-48.
- 30 Prediger, R.D., Fernandes, D., Takahashi, R.N., 2005a. Blockade of adenosine A2A receptors
31 reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behav Brain**
32 **Res** 159, 197-205.
33
- 34 Prediger, R.D., Pamplona, F.A., Fernandes, D., Takahashi, R.N., 2005b. Caffeine improves
35 spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) -
36 the spontaneously hypertensive rat (SHR). **Int J Neuropsychopharmacol** 8, 583-594.
37
- 38 Prediger, R. D., Takahashi, R. N., 2005c. Modulation of short-term social memory in rats by
39 adenosine A1 and A(2A) receptors. **Neurosci Lett** 16;376(3), 160-5.
40
- 41 Puumala, T., Routsalainen, S., Jakala, P., Koivisto, E., Riekkinen, P., Sirviö, J., 1996. Behavioral
42 and pharmacological studies on the validation of a new animal model of attention deficit
43 hyperactivity disorder. **Neurobiol. Learn. Mem** 66, 198-211.
44

1 Ramos, A., Berton, O., Mormede, P., Chaouloff, F., 1997. A multiple-test study of anxiety-
2 related behaviors in six inbred rat strains. **Behav. Brain Res** 85, 57-69.
3

4 Rapport, M.D., Moffitt, C., 2002. Attention deficit/hyperactivity disorder and methylphenidate. A
5 review of height/weight, cardiovascular, and somatic complaint side effects. **Clin. Psychol. Rev**
6 22(8):1107-31.
7

8 Ribeiro, J.A., Sebastião, A.M., de Mendonça, A., 2003. Adenosine receptors in the nervous
9 system: pathophysiological implications. **Prog Neurobiol** 68, 377–392.
10

11

12 Robbins, T.W., 2002. ADHD and Addiction. **Nature Medicine** 8(1), 24-25.
13

14 Roberts, H. R., Barone, J. J., 1983. Biological effects of caffeine. Historu and use. **Food Technol**
15 33-39
16

17 Robinson, T.E., Kolb, B., 2004. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse.
18 **Neuropharmacology** 47 Suppl 1, 33-46.
19

20 Rogers, P. J., Martin, J., Smith, C., Heatherlev, S. V., Smit, H. J., 2003. Absence of reinforcing,
21 mood and psychomotor performance effects of caffeine in habitual non-consumers of caffeine.
22 **Psychopharmacology (Berl)** 167(1), 54-62.
23

24 Rohde, L.A., Barbosa, G., Polankzick, G., Eizirik, M., Rassmussen, E., Neuman, R., 2001. Factor
25 and latent class analyses of DSM-IV ADHD symptoms in a school sample of Brazilian
26 adolescents. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 40, 711-8.
27

28 Rosin, D.L., Hettinger, B.D., Lee, A., Linden, J., 2003. Anatomy of adenosine A2A receptors in
29 brain: morphological substrates for integration of striatal function. **Neurology** 61, S12-18.
30

31 Rosin, D.L., Robeva, A., Woodard, RL., Guyenet, P.G., Linden, J., 1998. Immunohistochemical
32 localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. **J Comp Neurol** 401,
33 163-186.
34

35 Russell, V., de Villiers, A., Sagvolden, T., Lamm, M., Taljaard, J., 1995. Altered dopaminergic
36 function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of
37 attention-deficit hyperactivity disorder: the spontaneously hypertensive rat. **Brain Res** 676, 343–
38 351.
39

40 Russell, V., de Villiers, A., Sagvolden, T., Lamm, M., Taljaard, J., 1998. Differences between
41 eletrically-ritalin-and D-amphetamine-stimulated released of [3H]dopamine from brain slices
42 suggest impaired vesicular storage of dopamine in an animal model of Attention-Deficit
43 Hyperactivity Disorder. **Behav Brain Res** 94, 163-171.
44

- 1 Russel, V.A., 2002. Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex
2 slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder – the spontaneously
3 hypertensive rat. **Behav Brain Res** 130, 191–196.
4
- 5 Sadile, A.G., Pelicano, M.P., Sagvolden, T., Sergeant, J.A., 1996. NMDA and non-NMDA
6 sensitive $[^3H]$ -glutamate receptor binding in the brain of the Naples high- and low-
7 excitability rats: an autoradiographic study. **Behav. Brain Res** 78, 163-174.
8
- 9 Sagvolden, T., Sergeant, J.A., 1998. Attention deficit/hyperactivity disorder – from brain
10 dysfunction to behaviour. **Behav Brain Res** 94, 1–10.
11
- 12 Sagvolden, T., 2000. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an
13 animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **Neurosci Biobehav Rev** 24,
14 31–39.
15
- 16 Sagvolden, T., Johansen, E.B., Aase, H., Russel, V.A., 2005. A dynamic developmental theory of
17 attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and
18 combined subtypes. **Behav Brain Sci** 28(3), 397-419.
19
- 20 Sawynok, J., 1995. Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine. **Drugs** V.49, n.1,
21 37-50.
22
- 23 Seeman, P., Madras, B.K., 1998. Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and
24 amphetamine. **Mol. Psychiatry** 3, 386-396.
25
- 26 Silbergeld, E.K., Goldberg, A.M., 1974. Lead-induced behavioral dysfunction: an animal model
27 of hyperactivity. *Exp. Neurol.* 42, 146-157.
28
- 29 Shaywitz, B.A., Klopper, J.H., Yager, R.D., 1976. Gordon, J.W. Paradoxical response to
30 amphetamine in developing rats treated with 6-hydroxydopamine. **Nature** 261, 153-155.
31
- 32 Smit, H.J., Rogers, P.J., 2000. Effects of low doses of caffeine on cognitive performance, mood
33 and thirst in low and higher caffeine consumers. **Psychopharmacology** 152, 167-173.
34
- 35 Snyder, S.H., Katims, J.J., Annau, Z., Bruns, R.F., Daly, J.W., 1981. Adenosine receptors and
36 behavioral actions of methylxanthines. **Proc Natl Acad Sci USA** 78, 3260–3264.
37
- 38 Solanto, M. V., 2000. Clinical Psychopharmacology of AD/HD: implications for animals models.
39 **Neurosci Biobehav Rev** 24(1), 27-30.
40
- 41 Stefanovich, V., 1989. The xanthines. **Drug News Perspec** V.2, n. 2, 82-88.
42
- 43 Stanwood, G.D. Levitt, P., 2004. Drug exposure early in life: functional repercussions of
44 changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. **Curr Opin**
45 **Pharmacol** 4(1), 65-71.
46

- 1 Stoff, D.M., Friedman, E., Pollock, L., Vitiello, B., Kendall, P.C., Bridger, W.H., 1989. Elevated
2 platelet MAO is related to impulsivity in disruptive behavior disorders. **J. Am. Acad. Child.**
3 **Adolesc. Psychiatry** 28, 754-760.
4
- 5 Sutterer, J.R., Perry, J., De Vito, W., 1980. Two-way shuttle box and lever-press avoidance in the
6 spontaneously hypertensive and normotensive rat. **J Comp Physiol Psychol** 94, 155-163.
7
- 8 Svenningsson, P., Nomikos, G. G., Ongini, E., Fredholm, B. B., 1997. Antagonism of adenosine
9 A2A receptors underlies the behavioural activating effects of caffeine and is associated with
10 reduced expression of messenger putamen and nucleus accumbens. **Neuroscience** 79(3), 753-64.
11
- 12 Swanson, J.M., Sergeant, J.A, Taylor, E., Sonuga-Barke, E.J.S., Jensen, P.S., Cantwell, D.P.,
13 1998. Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. **Lancet** 351, 429-433
14
- 15 Swanson, J.M., Flodman, P., Kennedy, J., Spence, M.A., Moyzis, R., Schuck, S., Murias, M.,
16 Moriarty, J., Barr, C., Smith, M., Posner, M., 2000. Dopamine genes and ADHD. **Neurosci**
17 **Biobehav Rev** 24, 21-25.
18
- 19 Tannock, R., 1998. Attention-deficit/hyperactivity disorder: advances in cognitive,
20 neurobiological, and genetic research. **J Child Psychol Psychiat** 39, 65-99.
21
- 22 Takahashi, R.N., Pamplona, F.A., Prediger, R.D., 2008. Adenosine receptor antagonist for
23 cognitive dysfunction: a review of animal studies. **Front Biosci** 13, 2614-2632.
24
- 25 Taylor, E., 1998. Clinical foundations of hyperactivity research. **Behav Brain Res** 94, 11-24.
26
- 27 Terry, A.V. Jr., Hernandez, C.M., Buccafusco, J.J., Gattu, M., 2000. Deficits in spatial learning
28 and nicotinic-acetylcholine receptors in older, spontaneously hypertensive rats. **Neuroscience**
29 101, 357-368.
30
- 31 Terry, A.V.Jr., Hernandez, C.M., Buccafusco, J.J., Gattu, M., 2000. Deficits in spatial learning
32 and nicotinic-acetylcholine receptors in older, spontaneously hypertensive rats. **Neuroscience**
33 101(2), 357-68.
34
- 35 Thapar, A., Holmes, J., Poulton, K., Harreington, R., 1999. Genetic basis of attention-deficit and
36 hyperactivity. **Br J Psychiatry** 174, 105-11.
37
- 38 Ueno, K.I., Togashi, H., Mori, K., Matsumoto, M., Ohashi, S., Hoshino, A., Fujita, T., Saito, H.,
39 Minami, M., Yoshioka, M., 2002. Behavioural and pharmacological relevance of stroke-prone
40 spontaneously hypertensive rats as an animal model of a developmental disorder. **Behav**
41 **Pharmacol** 13, 1-13.
42
- 43 van Boxtel, M.P., Schmitt, J.A., Bosma, H., Jolles, J., 2003. The effects of habitual caffeine use
44 on cognitive change: a longitudinal perspective. **Pharmacol Biochem Behav** 75, 921-927.
45

1 van den Bergh, F.S., Bloemants, E., Chan, J.S., Groenink, L., Olivier, B., Oosting, R.S., 2006.
2 Spontaneously hypertensive rats do not predict symptoms of attention-deficit hypertensive
3 disorder. **Pharmacol Biochem Behav** 83, 380-390.
4
5 Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Gatley, S. J., Logan, J., Ding, Y. S., Hitzemann, R.,
6 Pappas, N., 1998. Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic
7 doses of oral methylphenidate. **Am j psychiatry** 155(10), 1325-31.
8
9 Volkow, N. D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Fischman, M., Foltin, R., Abumrad, N.N., Gatley, S.J.,
10 Logan, J., Wong, C., Gifford, A., Ding, Y.S., Hitzemann, R., Pappas, N., 1999. Methylphenidate
11 and cocaine have a similar in vivo potency to block dopamine transporters in the human brain.
12 **Life Sci** 65(1), PL7-12.
13
14 Volkow, N.D., Wang, G., Fowler J.S., Logan, J., Gerasimovm M., Maynard, L., Ding, Y.,
15 Gatley, S.J., Gifford, A., Franceschi, D., 2001. Therapeutic doses of oral methylphenidate
16 significantly increase extracellular dopamine in the human brain. **J Neurosci** 15;21(2), RC121.
17
18 Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Ding, Y.S., 2005. Imaging the effects of
19 methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-
20 deficit/hyperactivity disorder. **Biol. Psychiatry** 57, 1410-1415.
21
22 Wyss, J.M., Chambless, B.D., Kadish, I., van Groen, T., 2000. Age-related decline in water maze
23 learning and memory in rats: strain differences. **Neurobiol Aging** 21, 671-681.
24
25 Wyss, J.M., Fisk, G., van Groen, T., 1992. Impaired learning and memory in mature
26 spontaneously hypertensive rats. **Brain Res** 592, 135-140.
27
28 Wultz, B., Sagvolden, T., Moser, E.I., Moser, M., 1990. The spontaneously hypertensive rat as an
29 animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate on
30 exploratory behavior. **Behav and Neural Biol** 53, 88-102.
31
32 Zarrindast, M.R., Shafaghi, B., 1994. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on
33 acquisition of passive avoidance learning. **Eur J Pharmacol** 256, 233-239.
34
35 Zito, J.M., Safer, D.J., dosReis, S., Gardner, J.F., Boles, M., Lynch, F., 2000. Trend in the
36 prescribing of psychotropic medications to preschoolers. **Jama** 23;283(8), 1025-30.
37
38
39
40
41
42
43
44
45