

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOQUÍMICA

Catiane Bisognin Alves de Oliveira

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM CAFEÍNA NO DESENVOLVIMENTO
DOS NEURÔNIOS CORTICAIS E NA ANSIEDADE NO MODELO MURINO
DO TDAH**

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

BISOGNIN ALVES DE OLIVEIRA, CATIANE
INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM CAFEÍNA NO
DESENVOLVIMENTO DOS NEURÔNIOS CORTICAIS E NA ANSIEDADE
NO MODELO MURINO DO TDAH / CATIANE BISOGNIN ALVES DE
OLIVEIRA. -- 2021.
175 f.
Orientadora: LISIANE DE OLIVEIRA PORCIUNCULA.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Transtorno de Déficit de Atenção e
Hiperatividade. 2. Desenvolvimento Neuronal. 3.
Cafeína. 4. Ratos Espontaneamente Hipertensos. 5.
Ansiedade. I. DE OLIVEIRA PORCIUNCULA, LISIANE,
orient. II. Título.

Catiane Bisognin Alves de Oliveira

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM CAFEÍNA NO DESENVOLVIMENTO
DOS NEURÔNIOS CORTICAIS E NA ANSIEDADE NO MODELO MURINO DO
TDAH

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor (a) em Bioquímica.

Orientador(a): Profa. Dra Lisiane de Oliveira Porciuncula.

Porto Alegre

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu marido Thiago, por todo amor, compreensão, carinho e incansável apoio que sempre recebi de ti, obrigada por não me deixar cair e não desistir dos meus sonhos, você é essencial na minha vida, te amo muito!

Aos meus pais, Vera e Marco, e minha irmã Dani por todo apoio, ajuda, preocupação e dedicação comigo em todos os momentos que precisei mesmo com a distância vocês foram essenciais! Amo vocês!

A minha querida orientadora Prof^a Lisiane, por ter me aceitado como sua orientanda e por sempre estar disponível nos momentos em que precisei de sua orientação. Além disso, agradeço pela amizade e por você sempre manter uma relação de muito respeito e empatia não só comigo, mas com todos os colegas do laboratório, obrigada também por sempre nos manter alegres e confiantes com nosso trabalho, por mais que as coisas não estejam bem, a sua energia contagia!

Aos meus queridos colegas e amigos do Lab 26, Danizinha, Amandinha, Dani G, Fezinha, Marcus, Ana Helena e Ana Carolina eu agradeço muito todos vocês pelas nossas conversas, risadas, momentos de convívio dentro e fora do laboratório, e pela nossa amizade, que vou levar para o resto da vida! Agradeço também por toda ajuda nos meus experimentos em todos os momentos que precisei, sem falhar domingos e feriados. Sinto e sentirei muitas saudades de todos vocês!

Agradeço à "família Roska", "outra metade" do Lab 26, que me acolheram como parte da família, Marcelo, Randhall, Afonso, Nathan, Mônia, Marceli e

Pedrinho alunos do professor Roska, sempre foram muito queridos e amigos, obrigada por tornarem a convivência no laboratório tão divertida e por compartilharmos tantos momentos bons fora do laboratório também. Não posso deixar de agradecer ao querido professor Roska que me acolheu como uma filha em Porto Alegre, seu apoio foi fundamental, serei eternamente grata por tudo o que você fez por mim!

Aos meus queridos amigos e familiares de Santa Maria, agradeço todo o apoio e carinho que sempre tiveram comigo mesmo longe, em especial a minha madrinha, Tia Maria, que é minha segunda mãe, amo vocês!

Agradeço aos professores Dioguinho, Fábio e Renato sempre me trataram com muito carinho e sempre se disponibilizaram a me ajudar caso precisasse.

Agradeço aos colegas dos laboratórios 21, 24 e 28 pela convivência e ajuda sempre que precisei.

Por fim, agradeço aos funcionários da secretaria e servidores do Programa de Pós-Graduação, em especial aos meus amigos Douglas, Giordano e Cléia e minha amiga querida Silvana, obrigada pela amizade, momentos de convívio e pela competência no trabalho de vocês.

"We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained." - Marie Curie

APRESENTAÇÃO

Conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, esta tese de doutorado está organizada em três partes e os resultados estão apresentados na forma de artigo científico.

- Parte I: contém os Resumos, Lista de Abreviaturas, Introdução e Objetivos do trabalho.
- Parte II: contém os capítulos 1 e 2, apresentados na forma de artigos científicos publicados e/ou em preparação.
- Parte III: constitui-se da Discussão, Conclusões, e Referências Bibliográficas.

Introdução apresenta uma revisão bibliográfica sobre os temas discutidos ao longo da tese, e busca dar um embasamento para o entendimento e relevância do trabalho realizado. Os resultados são apresentados na Parte II, sob a forma de artigos científicos, onde há a descrição da metodologia utilizada, bem como os resultados e suas interpretações.

A Discussão e Conclusão englobam os capítulos descritos na Parte II, com interpretações e comentários gerais sobre os resultados presentes nos artigos científicos. As Referências Bibliográficas adicionais ao final desta tese representam as utilizadas apenas na Introdução e Discussão desta tese.

SUMÁRIO

PARTE I	16
RESUMO	17
ABSTRACT	19
LISTA DE ABREVIATURAS	20
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade: breve histórico.....	16
1.2 Diferenças entre os sexos no TDAH.....	20
1.3 Comorbidades do TDAH.....	22
1.4 Bases Neurobiológicas do TDAH.....	24
1.4.1 Etiologia	24
1.4.2 Fatores Genéticos	24
1.4.3 Achados de neuroimagem	27
1.5 Tratamento.....	31
1.6 Modelos Animais para o estudo do TDAH	32
1.8 Polarização Neuronal no Córtex Cerebral em Desenvolvimento	35
1.9 Cafeína	41
2 OBJETIVOS	48
2.1 Objetivos específicos	48
PARTE II	50
Capítulo 2.....	78
PARTE III	126
3 DISCUSSÃO	127
3.1 Comportamento relacionado à ansiedade e os efeitos da cafeína em ratos infantis do modelo do TDAH.	127
3.2 Os neurônios do córtex frontal do modelo de TDAH apresentaram atrasos nos padrões de diferenciação e no alongamento axonal.	131

3.3 A cafeína e o agonista do receptor A_{2A} restauram a ramificação e extensão do neuritos nos neurônios do modelo de TDAH.....	135
3.4 A cafeína e agonista do receptor A_{2A} via sinalização da PKA e PI3K restabelecem crescimento dos neuritos do modelo do TDAH.....	138
3.5 O bloqueio dos receptores A_{2A} recupera o crescimento axonal via sinalização PI3K nos neurônios modelo do TDAH.....	140
4 Conclusão	141
REFERÊNCIAS.....	144

PARTE I

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos neuropsiquiátricos do desenvolvimento mais comuns, sendo caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade. O TDAH pode ser frequentemente acompanhado de sintomas comórbidos como a ansiedade, o que dificulta o gerenciamento do tratamento em crianças. Embora o fármaco metilfenidato seja a primeira escolha de tratamento, cerca de 30% dos pacientes diagnosticados com TDAH não respondem ou toleram o tratamento. Portanto, outras estratégias farmacológicas ainda se fazem necessárias para o tratamento dos sintomas do TDAH. A cafeína é o psicoestimulante mais consumido em todo o mundo, seu alvo molecular é o antagonismo dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A}. Apesar dos efeitos benéficos da cafeína nos prejuízos cognitivos observados no modelo experimental do TDAH, evidências sobre os seus efeitos no perfil de ansiedade são pouco conhecidas. Além disso, abordagens celulares dos efeitos da cafeína nos modelos animais do TDAH foram pouco investigadas. Nesta tese, foram investigadas as diferenças entre os sexos no perfil de ansiedade em animais infantis do modelo animal mais utilizado para o estudo do TDAH, que são os ratos espontaneamente hipertensos, do inglês Spontaneously hypertensive rats (SHR), bem como as respostas ao tratamento com cafeína. Paralelamente, buscou-se encontrar alterações morfológicas durante o desenvolvimento *in vitro* de neurônios corticais do modelo animal do TDAH, e os efeitos da sinalização dos receptores de cafeína e adenosina A₁ e A_{2A}. No primeiro trabalho, a cafeína (0,3 g / L) foi administrada na água de beber aos filhotes da cepa controle Wistar-Kyoto (WKY) e SHR desde o 8º dia pós-natal (DPN) até o 23º (final da infância). O perfil de ansiedade foi avaliado do 21º ao 23º DPN na arena de campo aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE) e teste da caixa claro-escuro (CCE), respectivamente. Em relação aos achados comportamentais, enquanto os filhotes da cepa controle (WKY) apresentaram um perfil menos ansioso, os animais SHR de ambos os sexos mostraram comportamento relacionado à ansiedade em todos os testes comportamentais. A hiperlocomoção bem caracterizada nos animais SHR, foi observada em filhotes de ambos os sexos no CA e somente nos machos SHR no LCE e CCE. A cafeína não foi capaz de atenuar a ansiedade e a hiperlocomoção no modelo SHR de ambos os sexos, mas desencadeou ansiedade nas fêmeas da cepa controle WKY. Os resultados obtidos permitiram explorar diferenças sexuais no modelo de TDAH na ansiedade e hiperlocomoção na infância. No segundo trabalho, neurônios corticais cultivados de WKY (linhagem controle) e SHR foram analisados quanto aos parâmetros morfométricos dos neuritos, a imunorreatividade para a proteína tau após o tratamento com a cafeína ou agonistas e antagonistas dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A}. Além disso, o envolvimento das sinalizações PI3K e PKA também foram avaliados. Nossos resultados demonstraram que os neurônios do modelo de TDAH exibiram menos ramificações, menor comprimento máximo de neuritos e menor densidade de axônios, características de um padrão de crescimento e diferenciação mais atrasado. Os neurônios do modelo do TDAH tratados com cafeína tiveram seu padrão de diferenciação e crescimento somatodendrítico recuperado. O agonista do receptor de adenosina A_{2A} (CGS

21680) promoveu maior ramificação dos neuritos por meio da sinalização PKA. O antagonismo seletivo dos receptores de adenosina A_{2A} (SCH 58261), mas não a cafeína, foi eficaz na recuperação do crescimento axonal de neurônios do TDAH via sinalização da PI3K.

Nesta tese, foi possível identificar características de comorbidade do TDAH com transtornos de ansiedade e a possibilidade de explorar a ansiedade na infância. Por fim, evidenciamos pela primeira vez, que os neurônios do córtex frontal no modelo do TDAH apresentaram atraso no desenvolvimento e diferenciação, e que a cafeína e os receptores de adenosina A_{2A} podem atuar a nível neuronal, recuperando o crescimento de neurônios. Nossos achados reforçam o potencial da cafeína e dos receptores de adenosina A_{2A} como um tratamento adjuvante para o TDAH.

ABSTRACT

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common neuropsychiatric developmental disorders characterized by symptoms of inattention, hyperactivity and impulsivity. ADHD can often be accompanied by comorbid symptoms such as anxiety, which difficult treatment management in children. Although methylphenidate is the first choice of treatment, about 30% of patients will not respond or tolerate it. Therefore, other pharmacological strategies are still necessary for the treatment of ADHD symptoms. Caffeine is the most widely consumed psychostimulant drug worldwide, and its molecular target is the antagonism of adenosine receptors, mainly adenosine A₁ and A_{2A} receptors. Caffeine has been beneficial against cognitive impairments observed in an experimental model of ADHD. However, there was no evidence about the effects of caffeine at neuronal level in ADHD and also on the anxiety profile. In this thesis, we sought to find sex differences in the anxiety profile of infant SHR rats, as well as responses to caffeine treatment. In addition, morphological changes were investigated during the development *in vitro* of frontal cortex neurons from of the most validated animal model for ADHD studies, the Spontaneously hypertensive rats (SHR), as well as the effects of the caffeine and adenosine A₁ and A_{2A} receptors signaling. In the first study, caffeine (0.3 g/L, drinking water) was administered to pups WKY (control strain) and SHR, from their dams from postnatal day 8 (PND) to PND 23 (late childhood). Anxiety profile was evaluated from PND 21 to 23 in the open field (OF), elevated plus-maze (EPM) and light dark box test (LDB). Regarding behavioral findings, while animals infant WKY showed less anxiety behavior, SHR from both sexes showed anxiety-related behavior in all behavioral tests. Hyperlocomotion was observed in infant SHR of both sexes in OF, and only in male SHR in EPM and LBD. Caffeine was not able to attenuate anxiety and hyperlocomotion in the SHR model of both sexes, but triggered anxiety in infant females from control strain in the LDB. Our findings allow to explore sex differences in ADHD model in the anxiety and hyperlocomotion in childhood. In the second study, cortical neurons cultured from WKY and SHR were analyzed for neurite morphometric parameters, immunoreactivity for tau protein after treatment with either caffeine or A₁R and A_{2A}R agonists or antagonists. Besides, the involvement of PI3K and PKA signaling was also assessed. Our findings revealed that neurons in the ADHD model exhibited delayed outgrowth and differentiation (less branching and shorter maximum neurite length and lower axon density). Caffeine was able to recover neuronal somatodendritic differentiation, via PI3K and PKA signaling. The agonist of the A_{2A} adenosine receptor (CGS 21680) promoted more neurite branching via PKA signaling. The selective A_{2A}R antagonist (SCH 58261), but not caffeine, was efficient in recovering axonal outgrowth from ADHD neurons through PI3K signaling.

In this thesis, it was possible to examine features of ADHD comorbid with anxiety disorders and the possibility to explore childhood anxiety. Finally, we showed the first time that cultured frontal cortical neurons from ADHD model presented a clear pattern of impaired differentiation, and and that caffeine and A_{2A} adenosine receptors can act at the neuronal level, recovering the growth of ADHD neurons. Our findings reinforce the potential of caffeine and A_{2A} adenosine receptors as an adjunctive treatment for ADHD.

LISTA DE ABREVIATURAS

A₁ - Receptor metabotrópico de adenosina do subtipo A₁

A_{2A} - Receptor metabotrópico de adenosina do subtipo A_{2A}

CA – Teste do Campo Aberto

CGS 21680 – Agonista seletivo do receptor do subtipo A_{2A}

CPF - Córtex pré-frontal

CPA - N6-Cyclopentyladenosine, agonista seletivo do receptor de adenosina A₁

DA - Dopamina

DAT - Transportador de dopamina

DIV – Dias *in vitro*

DPCPX - Antagonista seletivo do receptor de adenosina A₁

DPN - Dia pós-natal

GSK3 - Glicogênio sintase cinase 3

KT5720 - inibidor da via PKA

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

LY294002 - inibidor da via PI3K

MAP-2 - proteína associada aos microtúbulos-2

MT - Microtúbulos

NE – Noradrenalina

NET - Transportador de Noradrenalina

PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase

PKA – proteína quinase - a

SCH 58261 - antagonista seletivo do receptor A_{2A}

SHR - do inglês *Spontaneously Hypertensive Rats* ou Ratos Espontaneamente Hipertensos

SNC - Sistema nervoso central

TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

WKY - Ratos Wistar-Kyoto

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade: breve histórico

O primeiro exemplo de um distúrbio que parece ser semelhante ao Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) foi dado por Sir Alexander Crichton em 1798 um médico escocês. Em 1798, ele publicou "*An inquiry into the nature and origin of mental derangement: comprehending a concise system of the physiology and pathology of the human mind and a history of the passions and their effects*" neste trabalho de três livros, ele relatou observações de casos clínicos de doença mental (Palmer; Finger 2001).

O segundo capítulo do livro II, "*On Attention and its Diseases*", Crichton descreve pacientes que apresentavam alteração da atenção, sua caracterização do distúrbio como "a incapacidade de atender com um grau necessário de constância a qualquer objeto" é consistente com o critério de diagnóstico da 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (do inglês, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) (DSM-V) de Desatenção onde descreve: "divagação em tarefas, falta de persistência, dificuldade de manter o foco e desorganização"(American Psychiatric Association, 2013). Crichton observou esses sintomas em crianças e, além disso, esses pacientes apresentavam dificuldades escolares (Crichton, 2008).

Mais adiante o médico Heinrich Hoffmann publicou em 1846 um livro ilustrado para crianças "*Der Struwwelpeter*", o qual descreve a história de dois personagens, o menino Fidgety Phil, que chama a atenção por apresentar comportamento hiperativo, e Hans Guck-in-die-Luft, um garoto que demonstra sintomas significativos de desatenção, revisado em Hoffmann (1995).

O trabalho do pediatra britânico George Frederic Still, publicado no Lancet em 1902, é considerada a primeira descrição médica do que poderia ser considerado o TDAH naquela época. Still descreveu 43 casos de crianças com problemas de atenção, afirmando que a atenção é um aspecto importante no controle moral do comportamento. Suas observações identificaram que a maioria das crianças apresentava por exemplo, excesso de atividades, agressividade ou desafiadoras. Para Still, essas crianças apresentavam um “defeito permanente ou temporário do controle moral” e ainda associou esse “defeito” a algum distúrbio cerebral. Parte dos pacientes descritos apresentavam transtornos mentais, mas alguns não apresentavam qualquer prejuízo no intelecto (Still et al., 1902).

O conceito do TDAH, naquela época ainda era desconhecido, alguns médicos denominavam como “síndrome hiperkinética” A primeira edição do DMS-I, de 1952, não faz menção específica ao TDAH. Entretanto, a publicação da segunda edição do Manual (DSM-II, em 1968) já descreve uma reação “hipercinética da infância ou adolescência caracterizada por inquietação, hiperatividade, distraibilidade e diminuição da capacidade de manter a atenção especialmente durante a infância” (Mayes e Rafalovich 2007).

Foi em 1980, a partir do (DSM-III), que o TDAH começou a ser melhor caracterizado, com critérios de diagnóstico mais definidos e delimitados. A American Psychological Association (APA) incluiu oficialmente o “Transtorno de Déficit de Atenção”, iniciando a nomenclatura contemporânea desse distúrbio. Entretanto, somente na terceira edição revisada do DSM-III-R, que o TDAH foi de fato se distinguindo de outras desordens psiquiátricas e inserido na categoria das desordens de comportamentos disruptivos, mas sendo apenas classificado

quanto a sua severidade (leve, moderado e grave), não havendo classificação de subtipos. Posteriormente, na quarta edição (DSM-IV, 1994), revisada em 2000, (DSM-IV-TR), a expressão “Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade” começa ser utilizada e a classificação de subtipos incluída (Mayes e Rafalovich, 2007).

Atualmente de acordo no DMS-V onde o diagnóstico é feito a partir de 18 sintomas (9 de desatenção, 6 de hiperatividade e 3 de impulsividade), sendo necessária a presença de pelo menos 6 ou mais sintomas de desatenção ou de hiperatividade/impulsividade para o preenchimento dos critérios de diagnóstico. Adultos devem apresentar ao menos cinco sintomas e um dos subtipos estar presente há pelo menos 6 meses (quadro 1) (American Psychiatric Association 2013). Com base nos tipos de sintomas, podem ocorrer três subtipos (apresentações) de TDAH (American Psychiatric Association 2013):

- **Apresentação combinada:** onde sintomas suficientes dos dois critérios, desatenção e hiperatividade/impulsividade estiveram presentes nos últimos seis meses.
- **Apresentação predominantemente desatenta:** quando sintomas suficientes de desatenção, mas não de hiperatividade/impulsividade, estiveram presentes nos últimos seis meses.
- **Apresentação predominantemente hiperativa/impulsiva:** se sintomas suficientes de hiperatividade/impulsividade, mas não desatenção, estiveram presentes nos últimos seis meses.

Quadro 1- Sintomas do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

Desatenção	Hiperatividade e impulsividade
Frequentemente deixa de prestar atenção aos detalhes ou comete erros descuidados nos trabalhos escolares, no trabalho ou com outras atividades.	Muitas vezes mexe com as mãos ou com os pés ou se contorce no assento escolar.
Muitas vezes, tem dificuldade em prestar atenção em tarefas ou atividades lúdicas.	Frequentemente deixa o assento em situações em que permanecer sentado é esperado.
Frequentemente, parece não escutar quando se fala diretamente.	Frequentemente corre ou sobe em situações em que não é apropriado.
Frequentemente, não segue as instruções e deixa de terminar os trabalhos escolares, as tarefas ou os deveres no local de trabalho.	Muitas vezes, é incapaz de jogar ou participar de atividades de lazer em silêncio.
Muitas vezes tem problemas para organizar tarefas e atividades.	Frequentemente age como se fosse dirigido por um motor.
Freqüentemente evita, não gosta ou reluta em realizar tarefas que exijam esforço mental por um longo período de tempo (como trabalhos escolares ou trabalhos de casa).	Muitas vezes fala excessivamente.
Muitas vezes perde o necessário para as tarefas e atividades (por exemplo, materiais escolares, lápis, livros, ferramentas, carteiras, chaves, papelada, óculos, telefones celulares).	Frequentemente deixa escapar uma resposta antes que uma pergunta seja concluída.
Muitas vezes é facilmente distraído.	Muitas vezes tem problemas para esperar a sua vez.
Muitas vezes é deleixado nas atividades diárias.	Freqüentemente interrompe ou se intromete em outras pessoas (por exemplo, intrometer-se em conversas ou jogos).

1.2 Diferenças entre os sexos no TDAH

De acordo com o estudo de metanálise de Polanczyk e colaboradores (2015), a prevalência mundial de transtornos mentais em crianças e adolescentes é de 13,4%, sendo que a taxa de prevalência estimada para o TDAH é de 3,4% e a persistência desde a infância até a idade adulta variam de 4,0% a 77,0% (Sibley et al., 2016). A atual prevalência de TDAH em adultos foi em média 2,8% entre as pesquisas e foi maior nos países com renda alta (3,6%) e média alta (3,0%) do que os países com renda baixa / média baixa (1,4%) (Fayyad et al., 2017). No Brasil, as taxas de prevalência para crianças de 5 a 13 anos, é cerca (5,1%) (Arruda et al., 2012), e para os adolescentes a adultos é cerca de (5,8%) (Polanczyk et al., 2010).

Existem diferenças na prevalência entre os gêneros no TDAH, clinicamente, os meninos são mais comumente diagnosticados com o subtipo combinado e mostram uma maior preponderância de sintomas hiperativos / impulsivos, enquanto as meninas com TDAH são mais frequentemente diagnosticadas com o subtipo desatento (Hinshaw et al., 2006; Pliszka, 2007; Fayyad et al., 2017). Entre os adultos com TDAH a maior prevalência encontrada é nos homens (Kessler et al., 2006; Fayyad et al., 2007; 2017).

Em crianças e adolescentes, o TDAH é mais comumente diagnosticado em meninos, com a proporção cerca de 2: 1 ou 3:1 (Nøvik et al., 2006; Ramtekkar et al., 2010). No entanto, as proporções sexuais parecem depender do tipo de amostra, sendo encontradas proporções mais altas para meninos do que meninas em amostras clínicas versus populacionais. Além disso, a proporção homem para mulher é menor em amostras clínicas de adultos do que em amostras de crianças e adolescentes (Biederman et al., 2004).

As diferenças entre os sexos na expressão fenotípica do TDAH são frequentemente propostas como uma explicação para as maiores taxas de diagnóstico de TDAH no sexo masculino. Uma hipótese comum é que as meninas com TDAH têm maior probabilidade de apresentar sintomas predominantemente desatentos e menos hiperativos / impulsivos do que os meninos (Arnold, 1996; Biederman et al., 1999). Portanto, a probabilidade de as meninas receberem um diagnóstico de TDAH é menor, pois manifestam os sintomas predominantemente desatentos e níveis mais baixos de comportamentos perturbadores (Gaub; Carlson, 1997). Isso sugere a relevância de um diagnóstico diferencial para meninos e meninas com sintomas de TDAH (Biederman et al., 1999; Rucklidge, 2010).

Os estudos também mostram diferenças entre os sexos no padrão de tratamento para o TDAH, sendo os meninos são mais propensos a receber a medicação para o TDAH do que as meninas (Derks et al., 2007). Acredita-se que as meninas e mulheres com TDAH sejam subdiagnosticadas e subtratadas (Rucklidge, 2010) e as diferentes taxas de tratamento farmacológico também podem ser devidas as diferentes manifestações do distúrbio.

As pesquisas que observaram diferenças sexuais neuroanatômicas em crianças com TDAH, encontraram evidências de menor volume total do cérebro e volume cerebelar (idades de 5 a 16 anos) (Castellanos et al., 2001), e redução da densidade de massa cinzenta no cerebelo direito em meninas com TDAH (8-10 anos) (Montes et al., 2011). Mahone e colaboradores (2011) realizaram uma análise detalhada da morfologia do lobo frontal em crianças de 8 a 12 anos, relatando um volume reduzido de massa cinzenta no córtex pré-motor lateral esquerdo em meninas com TDAH, enquanto os meninos com TDAH

apresentaram volume reduzido de substância branca no córtex pré-frontal medial esquerdo. Mais recentemente, Dirlikov et al. (2015), observaram diferenças na morfologia do lobo frontal em crianças com TDAH (idades de 8 a 12 anos), as meninas com TDAH apresentaram reduções gerais na área total da superfície do córtex pré-frontal, e os meninos reduções no córtex pré-motor. Os dados de Ernst et al. (1994) revelaram um metabolismo anormal da glicose em mais regiões em meninas (córtex pré-motor frontal direito, córtex temporal direito, putâmen posterior e córtex cingulado) do que nos meninos (redução na área pré-motora frontal esquerda).

1.3 Comorbidades do TDAH

O núcleo sintomatológico do TDAH geralmente não aparece sozinho, frequentemente uma grande variedade de transtornos psiquiátricos simultâneos contribui para o quadro psicopatológico de crianças, adolescentes e adultos com TDAH (Barkley; Russel, 2014) com desfechos negativos, como baixa qualidade de vida (Danckaerts et al., 2010), desemprego (Biederman; Faraone, 2006), e aumento da mortalidade (Dalsgaard et al., 2015). O custo econômico associado ao TDAH nos EUA, por exemplo, é estimado em US\$ 67-116 bilhões anuais devido à falta de produtividade (Biederman; Faraone, 2006).

A prevalência geral de transtornos psiquiátricos associados ao TDAH em crianças e adolescentes varia de cerca de 40 a 80 %, dependendo da amostra (Elia; Ambrosini; Berrettini, 2008; Larson et al., 2011; Yoshimasu et al., 2012). O TDAH também está associado a carências em vários domínios acadêmicos e sociais, e é comumente acompanhado por uma série de transtornos externalizantes e internalizantes incluindo as seguintes comorbidades: transtorno desafiador de oposição (35% a 60% dos casos), transtorno de

conduta (30% a 50% dos casos), ansiedade e transtornos de humor (20% a 40% dos casos) (Faraone; Biederman; Monuteaux, 2002; Biederman; Faraone, 2006; Faraone, et al., 2015).

Os pacientes com TDAH têm um risco maior de apresentar duas ou mais comorbidades psiquiátricas em comparação com indivíduos com outros transtornos psiquiátricos (Jensen et al., 2001). Em um estudo recente, Joelsson e colaboradores (2016) descreveram os diagnósticos psiquiátricos comórbidos mais comuns entre meninos e meninas com TDAH. Entre as crianças identificadas com TDAH, 76,7% apresentaram pelo menos outro diagnóstico psiquiátrico associado. Os diagnósticos comórbidos mais comuns foram distúrbios de aprendizagem e coordenação (48,1%), distúrbios de conduta (28,1%), transtornos de ansiedade (13,6%), distúrbios do espectro do autismo (12,0%) e depressão (8,9%). Os distúrbios de conduta e os distúrbios do espectro do autismo foram significativamente mais comuns entre os homens, enquanto os distúrbios de aprendizagem e coordenação, os transtornos de ansiedade e a depressão foram significativamente mais comuns entre as mulheres.

Pliszka (1992) relatou que indivíduos com TDAH e ansiedade comórbida tiveram uma pior resposta à medicação estimulante do que indivíduos sem ansiedade. Ainda, as crianças com TDAH e ansiedade podem apresentar déficits na memória de trabalho (Pliszka, 1989; Schatz e Rostain, 2006). Segundo os autores Tannock, Ickowicze e Schachar (1995), que investigaram o efeito do tratamento com metilfenidato em crianças diagnosticada com TDAH e ansiedade comórbida, o metilfenidato foi eficaz em melhorar a memória de trabalho apenas em crianças com TDAH, mas ineficaz para as crianças com TDAH e ansiedade.

1.4 Bases Neurobiológicas do TDAH

1.4.1 Etiologia

Embora a etiologia do TDAH ainda não esteja completamente elucidada, existem evidências de que fatores ambientais e genéticos contribuem para a vulnerabilidade ao transtorno (Banerjee; Middleton; Faraone, 2007). Fatores de risco perinatais, como o estresse materno, tabagismo ou consumo de álcool durante a gravidez, baixo peso ao nascer e prematuridade (Banerjee; Middleton; Faraone, 2007; Mi et al., 2002) aumentam o risco de crianças desenvolverem o TDAH. Além disso, a exposição a toxinas, como organofosforados, bisfenilos policlorados (do inglês *polychlorinated biphenyls* – PCBs), zinco e chumbo também foram implicados na etiologia do TDAH (Sciberras et al., 2017).

1.4.2 Fatores Genéticos

Embora seja bem aceita a alta hereditariedade do distúrbio (> 70%) (Biederman; Faraone, 2005), estudos genéticos procuraram associar quais os genes envolvidos na etiologia do TDAH. Os genes que regulam os sistemas de neurotransmissão estão implicados no TDAH, em estudos de meta-análises pesquisadores observaram “genes candidatos”, tais como o gene do transportador de dopamina (DAT1), dos receptores da dopamina D4 (DRD4) e D5 (DRD5), do transportador da serotonina (5HTT), do receptor da serotonina 1B (HTR1B) e um gene que codifica uma proteína reguladora da vesícula sináptica conhecida como proteína associada ao sinaptossoma de 25 kDa (SNAP-25) (Gizer; Ficks; Waldman, 2009).

Em outro estudo de meta-análise abrangendo todos os estudos de associação genética de adultos com TDAH, foi encontrada uma associação significativa entre TDAH em adultos e a BAIAP2 (proteína 2 associada ao inibidor 1 da angiogênese específica do cérebro). A BAIAP2 está envolvida na proliferação, sobrevivência, maturação neuronal e morfogênese da espinha dendrítica e pode afetar a orientação do cone de crescimento (Bonvicini; Faraone; Scassellati, 2016).

Muitos estudos investigaram polimorfismos no sistema dopaminérgico, como no genótipo transportador de dopamina (DAT ou SLC6A3) e no receptor D4 (DRD4), responsáveis por regular a expressão de sintomas de impulsividade e raiva (Faraone; Larsson, 2018; Hasler et al., 2015). No gene do DAT, as variantes mais estudadas são duas regiões de repetição em tandem de número variável (do inglês, variable tandem repeat polymorphism ou VTRP) de cerca de 40 pares de base, essa variante produz dois alelos comuns com 9 e 10 repetições (9R e 10R) (Faraone; Larsson, 2018). Em humanos, o alelo 10R deste polimorfismo foi associado ao TDAH em jovens (Faraone; Mick, 2010), enquanto o alelo 9R está associado ao TDAH em adultos (Franke et al., 2010). Em relação ao gene do receptor DRD4, o polimorfismo mais investigado é na região do terceiro éxon. Os alelos variam de duas a onze vezes (2R-11R) e os mais prevalentes são os 4R, 7R e 2R. No entanto a presença do alelo 7R tem sido associada ao TDAH em diversos estudos (Gizer; Ficks; Waldman, 2009; Gao et al., 2014; Li et al., 2014; Smith, 2010; Tovo-Rodrigues et al., 2013).

Ainda existem evidências que associam os polimorfismos no gene das neurotrofinas (NTs), que são proteínas que regulam a sobrevivência, diferenciação e crescimento de populações de neurônios durante o

desenvolvimento embrionário na fisiopatologia do TDAH (Liu et al., 2015, Tsai, 2003), principalmente do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês brain-derived neurotrophic fator). O BDNF é responsável pela proliferação, diferenciação, maturação e sobrevivência de neurônios (Shim et al., 2008). Em um estudo em polimorfismos do gene para o BDNF verificou-se uma associação entre os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) rs11030101 e rs10835210 e o TDAH (Cho et al., 2010). O polimorfismo do rs11030101 foi significativamente associado ao TDAH apenas em meninas, sugerindo uma associação específica de gênero entre o BDNF e o TDAH. Em outro estudo de sequenciamento em pacientes com TDAH, foram identificadas 12 variantes raras de nucleotídeos do BDNF que estavam associadas a um risco aumentado de TDAH, sugerindo que o BDNF pode ser um fator de risco genético para o TDAH (Hawi et al., 2017).

Além das anormalidades genéticas estão ainda os distúrbios na neurotransmissão das catecolaminas, presupõe-se que haja disfunção principalmente dos sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos, esses que por sua vez, regulam os processos de atenção, memória de trabalho, a tomada de decisão e o controle inibitório no córtex pré-frontal (CPF) (Arnsten, 2009).

Evidências apoiam que a disfunção dopaminérgica no TDAH seja, por exemplo, devida ao tratamento com psicoestimulantes interferir principalmente na transmissão dessa via (Zaidan et al., 1999), e pelo papel proeminente da transmissão dopaminérgica no controle motor (Chudasama e Robbins, 2006). Por meio de estudos de imagem, por tomografia por emissão de pósitrons (PET), foi verificada a disponibilidade reduzida dos subtipos D2 /D3 do receptor de DA em adultos com TDAH, que está relacionado com sintomas de desatenção (revisado por Prince, 2008). Ademais, estudos por tomografia computadorizada

de emissão de fóton único (SPECT), mostraram que a densidade do DAT estava consistentemente aumentada em pacientes com TDAH (revisado por Spencer et al., 2005). No modelo animal SHR, foram encontradas alterações na sequência do gene e aumento da expressão do DAT (Mill; Sagvolden; Asherson, 2005; Roessner et al., 2010), bem como densidades aumentadas do receptor de dopamina tipo 1 (DRD1) e tipo 5 (DRD5) (Carey et al., 1998).

No sistema noradrenérgico, verificou-se que os receptores alfa 2-adrenérgico ($\alpha 2A$), um receptor da NE, no CPF dorsolateral de macacos estão envolvidos no controle inibitório da atividade locomotora, um achado relevante no TDAH (Ma; Arnsten; Li, 2005). Variações genéticas no gene que codifica a dopamina beta-hidroxilase, que é responsável pela conversão da DA em NE, estão associadas a déficits na função executiva e atenção sustentada (Bellgrove et al., 2006; Kieling et al., 2008). Nos animais SHR, modelo animal do TDAH, evidências sugerem que há um desequilíbrio entre a neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica, que resulta em hiperfunção no sistema noradrenérgico e hipofunção no sistema dopaminérgico no córtex frontal quando comparado ao seu controle WKY (Russell, 2002).

1.4.3 Achados de neuroimagem

Existe um consenso em relação ao desenvolvimento atípico do cérebro no TDAH, em vários sistemas neurais, incluindo atenção, controle cognitivo e memória de trabalho (Arnsten; Rubia, 2012; Valera et al, 2007). As análises volumétricas mostraram reduções globais no volume total do cérebro, mais proeminentes no córtex pré-frontal, gânglios basais, cerebelo e regiões parieto-temporais (Castellanos et al., 2002; Valera et al., 2007; Nakao et al., 2011).

Estudos de neuroimagem mostraram alterações estruturais em várias regiões do cérebro de crianças e adultos com TDAH (Hoogman et al., 2017), anormalidades na região do córtex frontal (Arnsten, 2009 ; Seidman; Valera; Makris, 2005; Sowell et al., 2003), no CPF e pré-motor (Mostofsky et al., 2002), no cerebelo (Ivanov et al., 2014) e nos gânglios da base (Qiu et al., 2009), além dos córtices parietal e temporal (Castellanos et al., 2002; Shaw et al., 2006; Shaw et al., 2007).

Em estudos longitudinais foi demonstrado que, embora o desenvolvimento cortical de áreas sensoriais e motoras no TDAH siga um padrão semelhante ao das crianças saudáveis, no TDAH há um atraso acentuado ao atingir o pico de espessura na maior parte do cérebro, sendo esse atraso mais proeminente no CPF (Shaw et al., 2007; Shaw et al., 2012) (Figura 1). Essa região que está envolvida em uma série de funções, como a capacidade de suprimir respostas e pensamentos (Casey; Tottenham; Fossella, 2002; Casey et al., 2005), controle executivo de atenção (Kane; Engle, 2002), avaliação de recompensa (Ernst et al., 2004) e memória de trabalho (O'Reilly e Frank, 2006). O CPF recebe as conexões de todas as outras regiões corticais e exerce funções de planejamento e direcionamento do comportamento motor, cognitivo, afetivo e social ao longo do tempo. Possui um desenvolvimento prolongado, que permite a aquisição de habilidades cognitivas complexas através da experiência, mas torna-se suscetível a fatores que podem levar a um funcionamento anormal, o que muitas vezes se manifesta em distúrbios neuropsiquiátricos (Goldman-Rakic, 1995; Adhikari et al., 2010).

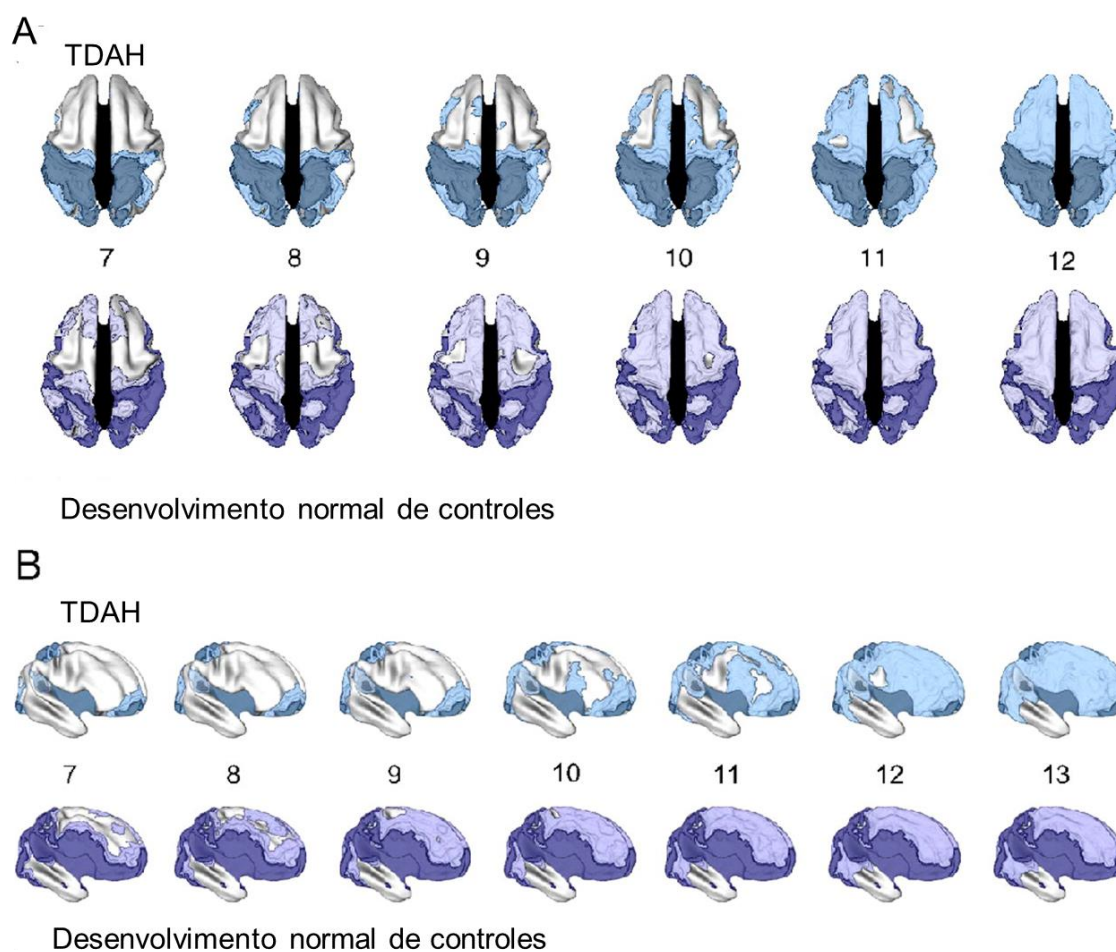


Figura 1- A imagem representa a idade ao atingir a espessura cortical máxima em crianças com TDAH em comparação com crianças com um desenvolvimento normal. (A) vista dorsal das regiões corticais onde a espessura do pico foi atingida em cada idade (mostrada, idades 7-12) no TDAH (acima) e nos controles com desenvolvimento normal (abaixo). As cores mais escuras indicam regiões onde um modelo quadrático não era apropriado (e, portanto, uma idade de pico não pôde ser calculada), ou a idade de pico foi estimada por estar fora da faixa etária escolhida. Ambos os grupos apresentaram uma sequência similar das regiões que alcançaram a espessura do pico, mas o grupo TDAH mostrou um atraso considerável ao atingir esse marco do desenvolvimento. (B) Vista lateral direita das regiões corticais onde a espessura do pico foi atingida em cada idade (mostrada, idades 7-13) no TDAH (acima) e nos controles com desenvolvimento normal (abaixo). Novamente, é evidente o atraso no grupo TDAH na obtenção da espessura cortical máxima. (Adaptada de Shaw et al., 2007).

As anormalidades neuroanatômicas também foram encontradas em adultos com TDAH que se assemelham às aquelas observadas em estudos com pacientes pediátricos. Por exemplo, Makris et al. (2007) encontraram que os adultos com TDAH apresentavam uma diminuição da espessura cortical nas regiões que sustentam a atenção e a função executiva, principalmente no hemisfério direito, envolvendo o lóbulo parietal inferior, o dorsolateral pré-frontal

e os córtices cingulados anteriores. Um estudo longitudinal investigou a trajetória de desenvolvimento cortical da infância até a idade adulta (Shaw et al., 2013) os autores compararam 92 indivíduos com TDAH, com 184 indivíduos controles, crianças (idade média de 10,7) e adultos (idade média de 23,8), mostrando exclusivamente alterações em relação ao curso clínico. Na idade adulta, os sintomas desatentos estavam presentes com mais persistência do que os sintomas hiperativos e impulsivos, e a gravidade dos sintomas foram associados à diminuição da espessura cortical nas regiões do córtex pré-frontal medial e dorsolateral. Outros estudos de imagem verificaram um maior volume do hipocampo e tamanho reduzido do complexo basolateral da amígdala (Plessen et al., 2006) e menor volume cerebelar (Mackie et al., 2007) em crianças e adolescentes com TDAH, os autores relacionaram essas alterações com a gravidade dos sintomas do TDAH.

Além disso, os estudos de ressonância magnética demonstraram uma diminuição do volume de substância branca em todo o cérebro, em particular, no córtex pré-frontal de pacientes com TDAH (Castellanos et al., 2002; Krain e Castellanos, 2006). Utilizando a técnica de imagem de tensor de difusão (ITD) para investigar a anisotropia fracionada (AF), uma medida da integridade do trato das fibras que compõem a substância branca, os autores confirmaram que as redes de controle motor e atenção estão prejudicadas no TDAH e que a AF reduzida no trato corticospinal e no fascículo longitudinal superior pode contribuir para sintomas de prejuízos de atenção, impulsividade e hiperatividade (Hamilton et al., 2010).

1.5 Tratamento

O tratamento do TDAH pode consistir em terapia medicamentosa e/ou terapia comportamental. O tratamento com medicação é recomendado para todas as crianças pela sua eficácia e por conferir um melhor prognóstico e menos problemas na idade adulta (Childress; Berry, 2012). O tratamento começou a ser usado no final da década de 1930, quando o psiquiatra Charles Bradley, em 1937, administrou uma anfetamina, o sulfato de benzedrina, em crianças na tentativa de aliviar dores de cabeça; no entanto, Bradley notou um efeito inesperado no comportamento das crianças: melhor desempenho escolar, interações sociais e respostas emocionais (revisado em Strohl et al., 2011).

Entretanto foi a descoberta do metilfenidato em 1954 que permitiu um avanço para o tratamento do TDAH. O primeiro estudo clínico publicado sobre o metilfenidato foi realizado por Zimmerman e Burgemeister em 1958, e os sujeitos deste estudo foram 108 crianças e adultos com "problemas emocionais", incluindo hiperatividade. A eficácia do metilfenidato no tratamento de distúrbios de comportamento em crianças foi posteriormente confirmada. Em 1961, foi aprovado pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) para o tratamento de distúrbios de comportamento na infância (revisado por Baumeister et al., 2012).

Atualmente, a intervenção de primeira escolha para o tratamento do TDAH ainda são os psicoestimulantes (Moriyama et al., 2013), sendo o metilfenidato o mais utilizado em adultos e o mais recomendado para crianças e adolescentes (Seixas et al., 2012). Sua ação promove um aumento das concentrações de DA e NE no cérebro e efetivamente reduz a hiperatividade em indivíduos com TDAH. O mecanismo de ação do metilfenidato é inibir o DAT e em menor escala o

transportador de noradrenalina (NET), inibindo assim a recaptação de DA e NE na fenda sináptica (Volkow et al., 1995). Apesar de ser considerado eficaz para o tratamento do TDAH, em torno de 65% das crianças diagnosticadas com TDAH irá responder e tolerar o metilfenidato, porém 35% não o fazem (Hodgkins *et al.*, 2012). Além disso, alguns efeitos adversos são descritos, tais como: distúrbios do sono e apetite, problemas de crescimento, cardiovasculares e o desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos, sendo a maioria destes transitórios (Huss et al., 2017).

1.6 Modelos Animais para o estudo do TDAH

Modelos animais fornecem informações importantes sobre a neuroquímica subjacente a aspectos específicos do comportamento do TDAH, quando comparados aos controles apropriados. As diferenças entre o comportamento de um modelo animal e seu controle podem ser correlacionadas com diferenças em sua neuroquímica e farmacologia comportamental (Russell; Sagvolden; Johansen, 2005).

Assim, um modelo animal de TDAH deve mimetizar as características comportamentais fundamentais do TDAH (validade da face), deve estar em conformidade com a literatura (validade de constructo) e prever correlatos do TDAH em humanos em relação ao comportamento, genética e funções neuronais, além da capacidade do modelo animal de responder a tratamentos bem documentados para o transtorno (validade preditiva) (Sagvolden, 2000). A Tabela 1 mostra a variedade de modelos propostos para o TDAH e uma análise quanto aos critérios de validação.

Tabela 1. Modelos animais propostos para o estudo do TDAH.

Modelo Animal	Validade de face	Validade Preditiva	Validade de Constructo ^a
Anóxia	Hiperatividade Falta de atenção		Disfunções dopaminérgicas e serotoninérgicas
Camundongo <i>Coloboma</i>	Hiperatividade Falta de atenção	Hiperatividade diminui com psicoestimulantes	Disfunções dopaminérgicas e noradrenérgicas
Camundongo <i>Alcallosal</i>			
DAT-KO	Hiperatividade Falta de atenção	Hiperatividade diminui com psicoestimulantes	Disfunções dopaminérgicas
Expostos ao chumbo	Hiperatividade	Hiperatividade diminui com psicoestimulantes	Disfunções dopaminérgicas
Expostos ao PCB	Hiperatividade Impulsividade	Hiperatividade diminui com psicoestimulantes	
Isolamento	Hiperatividade Falta de atenção		
Lesão Colinérgica	Falta de atenção		
Lesão com 6-OHDA	Hiperatividade Falta de atenção	Hiperatividade diminui com psicoestimulantes	Disfunções dopaminérgicas
Lesão do Núcleo Accumbens	Hiperatividade Impulsividade		
Lesão Noradrenérgica	Falta de atenção		
Lesão Subtalâmica	Impulsividade Falta de atenção		
NHE	Hiperatividade		
Performance fraca no 5-CSRT	Hiperatividade Falta de atenção Impulsividade	Impulsividade diminui com psicoestimulantes	
Raio-X	Hiperatividade	Hiperatividade diminui com psicoestimulantes	
Ratos <i>Wig</i>	Hiperatividade Falta de atenção		
Rato com comportamento Hipossexual	Hiperatividade Falta de atenção	Hiperatividade não foi diminuída com psicoestimulantes	
SHR	Hiperatividade Falta de atenção Impulsividade	Hiperatividade e impulsividade diminuem com psicoestimulantes	Disfunções dopaminérgicas e noradrenérgicas
WKHA	Hiperatividade		

DAT-KO, ratos *knockout* para os transportadores de dopamina; PCB, bifenil policlorado; 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; NHE, ratos Níptes de alta excitabilidade; 5-CSRT, tarefa de tempo de reação em série de cinco opções; SHR, ratos espontaneamente hipertensos; WKHA, ratos Wistar-Kyoto hiperativos. (a) validade de construto, neste trabalho, baseou-se em alterações no sistema monoaminérgico. (Adaptado de Sagvolden et al., 2005).

O modelo animal mais utilizado para o estudo do TDAH é a estirpe de ratos espontaneamente hipertensos SHR (SHR, do inglês, Spontaneously Hypertensive Rats) (Sagvolden, 2000). Esses animais desenvolvem hipertensão somente na idade adulta, e antes desse período preenchem o critério de validade de face, pois apresentam os principais sintomas do TDAH, como, desatenção, hiperatividade e impulsividade, mimetizando as características comportamentais do transtorno (Sagvolden, 2000; Sagvolden et al., 2005). O modelo também está de acordo com a fundamentação teórica (validade de construto), pois os SHR apresentam diferenças entre os sexos, diminuição do volume cerebral (Sagvolden, 2000; Sagvolden et al., 2005), alterações nos sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos que incluem diminuições da dopamina no estriado, núcleo caudato e accumbens (Hsu et al., 2010) e alterações no metabolismo da NE pelo achado de que a expressão do gene da tirosina hidroxilase é maior na medula oblonga ventrolateral no SHR do que no WKY (Reja et al., 2002), consistente com a concentração elevada de NE em várias áreas do cérebro do SHR, incluindo locus coeruleus, substância negra e córtex frontal (Villiers et al., 1995).

Além disso, os ratos SHR apresentam uma diminuição na atividade locomotora e uma melhora nos prejuízos de aprendizagem após o tratamento com metilfenidato (Ueno et al., 2002; Sagvolden et al., 1992; Wultz et al., 1990), e diminuição do comportamento impulsivo (Bizot et al., 2007; Somkuwar et al. 2016), semelhante ao que ocorre com os pacientes com TDAH. O modelo é capaz de prever correlatos de TDAH em seres humanos no que se refere a comportamento, genética e funções neuronais, e, portanto, também preenchem o critério de validade preditiva (Sagvolden, 2000; Sagvolden et al., 2005).

Existem algumas limitações do modelo SHR, como qualquer modelo animal, por exemplo, alguns autores mostraram que o SHR não apresenta os sintomas do TDAH de forma consistente e que os efeitos do metilfenidato em diminuição a hiperatividade ou impulsividade ocorrem apenas em ratos WKY e Wistar (Van Den Bergh et al., 2006). Mais recentemente em uma revisão sistemática e metanálise de estudos que avaliaram os efeitos comportamentais do metilfenidato no modelo SHR, foi verificado que o metilfenidato aumentou o desempenho em tarefas de atenção e prejuízos mnemônicos no SHR e diminuiu seu comportamento impulsivo, porém não foi observado efeito na hiperatividade (locomotoão) (Leffa et al., 2019), conferindo uma resposta distinta ao tratamento nos pacientes com TDAH. Os autores apoiam que isso ocorre devido às diferenças na fisiopatologia intrínseca ao modelo SHR. Apesar dessas críticas, o modelo SHR continua sendo o modelo animal mais utilizado para o estudo do TDAH (Sagvolden et al., 2005).

1.8 Polarização Neuronal no Córtex Cerebral em Desenvolvimento

A formação de uma rede neuronal funcional no córtex cerebral depende da coordenação de dois processos celulares altamente organizados, como a migração neuronal e a maturação neuronal. Essas mudanças morfológicas são medidas importantes para a maturação neuronal, especialmente a ramificação dendrítica, uma vez que a morfologia dendrítica determina o número, o padrão e os tipos de sinapses recebidos por um neurônio, sendo, portanto, fundamental para o bom funcionamento do cérebro (Arnsten; Rubia, 2012).

Os processos de neurogênese (formação de novos neurônios) e migração celular são orquestrados por sinais extracelulares e intracelulares. Não é de surpreender que muitos distúrbios do desenvolvimento cerebral surjam através

de mutações em genes que codificam proteínas citoesqueléticas, como a epilepsia (Leventer; Guerrini; Dobyns, 2008; Reiner; Sapir, 2009). A estrutura citoesquelética neuronal inclui: (i) microfilamentos de actina; (ii) filamentos intermediários; e (iii) microtúbulos (MT), todos compreendendo os substratos essenciais para todo o programa de neurodiferenciação (Barnes; Polleux, 2009; Chhabra; Higgs, 2007).

O estabelecimento da organização assimétrica de componentes celulares, denominada polaridade celular, envolve vários processos que contêm eventos de tráfico de membrana e dinâmica do citoesqueleto (Tang e Wang, 2013), o qual resulta na morfogênese de vários tipos celulares (Lecuit, 2003).

A polarização é essencial para que uma célula desempenhe seu papel corretamente, e está no centro de muitos processos biológicos, incluindo migração e quimiotaxia. Os neurônios estão entre os tipos celulares mais polarizados, e são constituídos de domínios funcionalmente distintos: o axônio e os dendritos. Os neurônios formam um único axônio e múltiplos dendritos que são a base do fluxo de transferência de informações no sistema nervoso central (Barnes e Polleux, 2009; Hansen et al., 2017).

Os dendritos são prolongamentos do neurônio que garantem a recepção de sinais aferentes de outras células nervosas, que desencadeiam a geração do potencial de ação no soma (corpo celular) e que se propagam ao longo do axônio fazendo contatos pré-sinápticos com os dendritos dos neurônios-alvo. A presença de um axônio em células neuronais determina o fluxo direcional do sinal, e a desregulação da polaridade celular pode causar distúrbios do neurodesenvolvimento (Barnes e Polleux, 2009).

Historicamente, o advento das culturas neuronais dissociadas *in vitro* forneceu um modelo experimental a fim de melhorar a compreensão da biologia celular da polaridade neuronal. Trabalhos pioneiros usando essas culturas estabeleceram um paradigma onde neurônios isolados em cultura podem adotar domínios dendríticos e axonais espacial e funcionalmente distintos (Dotti; Sullivan; Banker, 1988; Goslin; Banker, 1989). A análise dessas culturas levou à observação de que culturas de neurônios do hipocampo passaram por vários estágios, desde as células do estágio 1, recém obtidas com neuritos imaturos, até o estágio 5, onde as células apresentam axônios maduros, dendritos, espinhos dendríticos e sinapses funcionais (Figura 2). Esta importante abordagem experimental revelou que o estabelecimento de domínios axonais e somato-dendríticos distintos requer remodelação extensa do citoesqueleto de actina e microtúbulos, onde a polarização segue uma sequência de eventos celulares que incluem instabilidade de filamentos de actina (Bradke; Dotti, 1999), com crescimento e estabilização simultâneos de microtúbulos em um neurito (Witte; Neukirchen; Bradke, 2008), seguidos de fluxo vetorial de várias proteínas e organelas para apoiar o alongamento axonal (Bradke; Dotti, 1999) (Figura 3b).

No entanto, deve-se notar que, nas culturas clássicas, como as de córtex e hipocampo de embriões de rato com 18 dias (E18), as células utilizadas são neurônios pós-mitóticos após a dissociação e, portanto, a polarização neuronal usando este modelo *in vitro* corresponde à "re-polarização" de neurônios previamente polarizados *in vivo*. Portanto, é importante ter em mente que as manipulações moleculares neste modelo *in vitro* atuam sobre neurônios previamente polarizados (Barnes e Polleux, 2009).

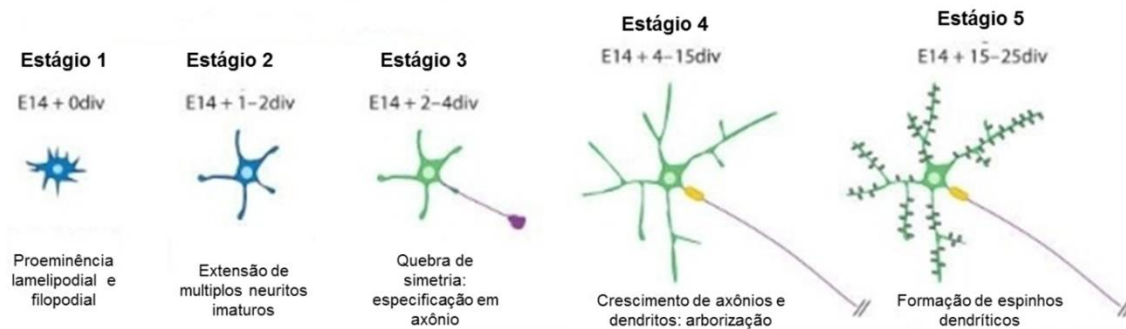


Figura 2- Processos de polarização de neurônios corticais *in vitro*. No estágio 1, os neurônios pós-mitóticos imaturos (fase embrionária E14) exibem atividade protrusiva lamelipodial e filopodial intensa que leva ao surgimento de neuritos imaturos únicos para o estágio 2. O estágio 3 representa um passo crítico onde a simetria neuronal se desfaz e um neurito único cresce rapidamente para se tornar o axônio (roxo), enquanto outros neuritos se tornam dendritos. O estágio 4 caracteriza-se por crescimento rápido de axônios e dendritos. Finalmente, os neurônios do estágio 5 são terminalmente diferenciados e apresentam espinhos dendríticos e o axônio (adaptada de Barnes e Polleux, 2009).

A interrupção inicial da simetria dos neurônios (estágio 1) resulta da inibição da via de sinalização RhoA/ROCK-profilin IIa, levando à desestabilização do citoesqueleto de actina, que, por sua vez, permite o surgimento inicial dos neuritos (Da Silva et al., 2003). A especificação e o alongamento do axônio a partir de um neurito ocorrem do estágio 2 ao estágio 3 (Dotti, 1988) (Figuras 2 e 3a), durante o qual, a sobreposição das vias de sinalização regula a polarização, promovendo a desestabilização assimétrica da F-actina no cone de crescimento do futuro axônio (Figura 3c).

Além disso, GTPases da família Rho são reguladoras centrais do citoesqueleto de actina, e a regulação de sua atividade é essencial para o estabelecimento da polarização neuronal. Estudos revelam vias envolvendo a GTPase RhoA, que é indiretamente regulada pela gangliosídeo sialidase de membrana plasmática (PMGS) (em amarelo na Figura 3c) que se acumula na ponta do futuro axônio. As PMGS ativas, desencadeiam a inibição da sinalização de RhoA dependente de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e Rac1 a fim de bloquear o complexo ROCK/profilin IIa e induzir a desestabilização da F-actina

para promover a axogênese (no futuro axônio) (Da Silva et al., 2003). Da mesma forma, a ativação assimétrica da quinase ativada por p21 (Pak1) induz a inativação da cofilina e estabilização da F-actina (Jacobs et al., 2007).

Outras vias moleculares que regulam a estabilidade dos microtúbulos nos neurônios também promovem a polarização neuronal (Figura 3c). Entre elas, a via da glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3) controla a polarização celular, regulando por exemplo, as proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) (Barnes e Polleux, 2009). Além disso, a GSK-3 atua a jusante à PI3K e representa um segundo elemento que controla a axogênese e a polaridade neuronal, ao ponto que a inibição de GSK3 (Shi et al., 2004) ou a supressão de sua isoformas GSK3 α / β evitam que os neurônios se polarizem (Garrido et al., 2007).

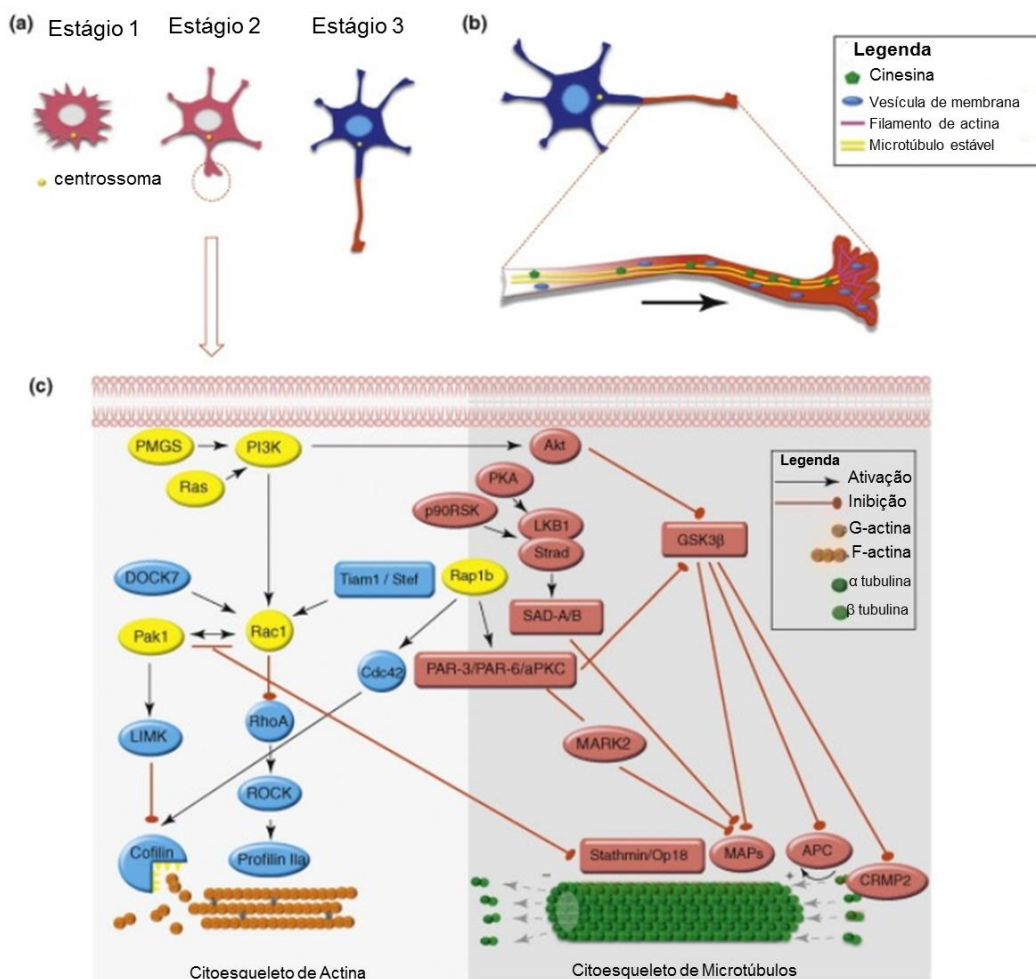


Figura 3. Regulação molecular da polarização neuronal. (a) Etapas do desenvolvimento de neurônios cultivados, mostrando a quebra de simetria que começa no estágio 2 dos neurônios com o aumento do cone de crescimento do axônio seguido pelo crescimento do axônio (vermelho) durante o estágio 3, diferentes processos de regulação da polarização neuronal (c). (b) Tráfego citoplasmático dirigido no axônio de um neurônio polarizado do estágio 3. Organelas de membrana e proteínas citosólicas (vermelho) acumulam-se no neurito, diferenciando-se em um axônio. A coordenação de várias vias moleculares está subjacente à especificação dos axônios durante a polarização dos neurônios. Esse processo requer a contribuição de fatores de remodelação do citoesqueleto de actina (azul), e fatores que regulam a dinâmica dos microtúbulos (vermelho), alguns fatores estão na regulação dos microtúbulos e do citoesqueleto de actina, como PI3K (amarelo). (adaptada de Heng; Chariot; Nguyen, 2010).

Outros fatores cruciais para polarização dos neurônios são, por exemplo, a serina / treonina quinase LKB1 (também chamada de PAR-4) são necessárias para a especificação axonal de neurônios corticais *in vivo*. Uma vez complexado com Strad, o LKB1 é ativado por quinases, como PKA e p90RSK, e depois fosforila as quinases SAD-A / B, que por sua vez fosforilam a MAP necessária para a especificação do axônio (Barnes et al., 2007).

Portanto, o estabelecimento e manutenção da polaridade neuronal crescimento axonal envolvem a regulação dinâmica dos citoesqueletos de actina e MT, com participação crucial de diferentes proteínas das vias de sinalização envolvidas processos nesses processos.

Além disso, todos esses processos que influenciam na maturação dos neurônios no cérebro em desenvolvimento à medida que nascem, crescem, migram e amadurecem em unidades funcionais da circuitaria cortical, apoiam a hipótese da neurobiologia do desenvolvimento subjacente à distúrbios neuropsiquiátricos e do neurodesenvolvimento (Bakhshi; Chance, 2015; Marín, 2016; Schubert; Marten; Kolk, 2015; Shelton et al., 2015).

Ao contrário de muitos estudos sobre achados comportamentais no modelo animal do TDAH, não há na literatura dados disponíveis que explorem o padrão de desenvolvimento neuronal *in vitro*, o que provavelmente poderia contribuir para o entendimento da neurobiologia do TDAH.

1.9 Cafeína

Atualmente, a cafeína é a substância psicoestimulante mais consumida no mundo, está presente em várias fontes alimentares, como chá, café, chocolate e refrigerantes (Fredholm et al., 1999). A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcaloide, do grupo das xantinas encontrado naturalmente em mais de 60 plantas, algumas fontes comuns de cafeína são a noz de cola (acuminato de cola), o feijão de cacau (*Theobroma cacao*), a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e as bagas de guaraná (*Paullinia cupana*); no entanto, grãos de café torrados (*Coffea Arabica* e *Coffea robusta*) e folhas de chá (*Camelia siniensis*) são as principais fontes mundiais de cafeína na dieta (Baron; Roberts, 1996).

A história mais conhecida sobre os efeitos da cafeína foi relatada por um pastor de cabras chamado Khaldi, no sul da Abissínia, no ano de 850, ele percebeu que suas cabras depois de mastigar bagas de arbustos, que seriam plantas que contiam cafeína, apresentavam comportamento agitado. O monge do mosteiro observou esse comportamento, e resolveu experimentar e como resultado observou que ele e outros monges foram mantidos mais alertas durante suas longas orações à noite (Fredholm, 2011). As bebidas que contêm cafeína, como chá e café foram difundidas nos séculos XV e XVI em países árabes e nos séculos XVIII e XIX na Europa. Atualmente, muitas pessoas iniciam o dia com uma xícara de café. Parece que os efeitos da cafeína eram conhecidos muito antes de se tornar parte de bebidas diárias (Fredholm, 2011).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC, 2020), o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, e é segundo maior mercado consumidor de café, sendo os Estados Unidos o maior consumidor. O consumo de cafeína em todas as fontes é bem variado, a média estimada é cerca de 70 a 76 mg / pessoa / dia em todo o mundo, ou 5-8 mg/kg/dia (equivalente a 3 xícaras de café) (Fredholm et al., 1999). A absorção de cafeína pelo trato gastrointestinal é rápida e atinge 99% nos seres humanos em cerca de 50 minutos após a ingestão (Marks e Kelly, 1973; Arnaud, 1976).

As propriedades hidrofóbicas da cafeína permitem sua passagem por todas as membranas biológicas, inclusive pela barreira hematoencefálica (Lachance; Marlowe; Waddell, 1983; Tanaka, et al., 1984). O pico de concentração plasmática de cafeína é atingido entre 15 e 120 minutos após a ingestão oral em humanos e é igual a 8 a 10 mg/L para doses de 5 a 8 mg/kg (Arnaud e Welsch, 1982; Bonati et al., 1982).

A ação farmacológica da cafeína consiste no bloqueio dos receptores de adenosina, que é um nucleosídeo de purina endógeno ubíquo, liberado pela maioria das células, incluindo neurônios e glia, e modula muitos processos fisiológicos e bioquímicos no cérebro (Cunha, 2001; Fredholm et al., 1999). A adenosina funciona como uma molécula de sinalização através da ativação de quatro receptores metabotrópicos A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (Fredholm et al., 2001).

Os receptores de adenosina do tipo A_1 e A_{2A} são os mais expressos no sistema nervoso central (SNC), e são os alvos farmacológicos da cafeína (Cunha, 2001; Fredholm et al., 1999). A adenosina atua como um neuromodulador no SNC, e as suas ações são mediadas pelos receptores A_1 envolvem inibições na transmissão sináptica, enquanto nos receptores A_{2A} a adenosina exerce ações facilitatórias (Cunha, 2008).

Os receptores A_1 são amplamente expressos nos tecidos periféricos (Jacobson e Gao, 2006), enquanto no SNC a expressão é abundante no córtex, cerebelo e no hipocampo (Sebastião e Ribeiro, 2009). As ações dos receptores A_1 nas sinapses consistem em inibir a transmissão sináptica, e isso é mais provável devido a uma ação inibitória sobre a liberação de glutamato e as respostas sinápticas mediadas pelo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Ribeiro; Sebastião; de Mendonça, 2002).

Já o subtipo do receptor de adenosina A_{2A} apresenta maior densidade no estriado (neurônios GABAérgicos de projeção estriado-palidal, interneurônios colinérgicos), no núcleo accumbens e bulbo olfatório (Rosin et al., 1998), e é expresso em menor quantidade no hipocampo (Sebastião e Ribeiro, 1996; Moreau e Huber, 1999). Foi descrito que a ativação dos receptores de adenosina A_{2A} , promove a neuritogênese e diferenciação, o aumento do alongamento

axonal e a ramificação dendrítica em culturas primárias de neurônios estriados ou corticais (Canals et al., 2005; Ribeiro et al., 2015), além de contribuir para a migração de neurônios de projeção cortical, controlando sua polarização, formação e crescimento de axônios em culturas de neurônios corticais (Alçada-Morais, et al., 2021).

Em relação aos receptores de adenosina A_2B foi demonstrado que estes estão distribuídos em níveis mais baixos no neocórtex (Dixon et al., 1996), enquanto os receptores A_3 , aparecem em níveis moderados no cerebelo e hipocampo (Fredholm et al., 2001)

Há um grande interesse nos estudos sobre efeitos da cafeína em doenças neuropsiquiátricas, visto que o sistema purinérgico é um dos sistemas envolvidos na neurobiologia dos distúrbios psiquiátricos (Cheffer et al., 2018), a manipulação dos receptores de adenosina e a cafeína podem ser um alvo potencial (Cunha et al., 2008; Ferré et al., 2018). Os efeitos da cafeína durante o desenvolvimento do SNC ainda estão sendo investigados. A cafeína pode causar efeitos distintos quando administrada em diferentes dias do período pós-natal, de acordo com o estudo de Tchekalarova; Kubova e Mares (2005) o tratamento com a cafeína (10 e 20 mg / kg) administrada entre os dias 7 e 11 pós-natal (DPN) que correspondem ao terceiro trimestre de gestação, causa hiperlocomoção, enquanto que, quando administrada no DPN 13 e 17, os animais eram menos ativos que os controles.

Resultados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que ratos púberes tratados com cafeína desde o período gestacional apresentam diferenças comportamentais de acordo com o sexo, com as fêmeas apresentando prejuízos e os machos melhorando a memória de reconhecimento. Por outro lado, a

caféina aumentou a locomoção em animais de ambos os sexos (Ardais et al., 2016; Sallaberry et al., 2013). Ratos machos tratados durante o período da adolescência com caféina apresentaram comportamento ansioso mais exacerbado, mas sem alterações na sua atividade locomotora e na memória de reconhecimento (Ardais et al., 2014). O tratamento crônico com uma dose moderada de caféina, somente no período embrionário e lactacional, aumentou a susceptibilidade a convulsões na vida adulta por diminuir a migração de neurônios GABAérgicos (Silva et al., 2013). Doses elevadas (1,0 mg/mL) administradas no período embrionário promoveram alterações na expressão do BDNF e proteínas relacionadas no hipocampo e córtex dos embriões, mas em dose baixa (0,1 mg/mL) e moderada (0,3 mg/mL) o número de neurônios aumentou no córtex e no hipocampo (Mioranza et al., 2014).

Os efeitos da caféina mediados pelo bloqueio dos receptores de adenosina A_{2A} , têm prevenido a neurodegeneração e os prejuízos cognitivos e motores em modelos animais da Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson (Chen et al., 2001; Dall'igna et al., 2007; Espinosa et al., 2013; Xu et al., 2016). Dados do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que os prejuízos cognitivos decorrentes da idade são prevenidos pela administração crônica de caféina, e estão relacionados com modificações em proteínas sinápticas, no BDNF e sua forma precursora e seu receptor TrkB (Botton et al., 2017; Costa et al., 2008; Sallaberry et al., 2013).

Sabe-se que existe uma interação física e funcional entre receptores de dopamina D_2 (receptores afetados no TDAH) e os receptores de adenosina A_{2A} , dados experimentais indicam a existência de heterômeros entre eles os (A_{2A} e D_2), como principal responsável pela integração da neurotransmissão de

adenosina e dopamina, e envolvida nos efeitos psicomotores e de reforço da cafeína (Ferré et al., 2018; Ferré, 2016).

Acredita-se que o mecanismo subjacente da cafeína poderia ser a redução na expressão do transportador de dopamina e, conseqüentemente, na recaptação de dopamina no córtex frontal e estriado, em ratos SHR, principal modelo animal validado do TDAH (Pamplona et al., 2009; Pandolfo et al., 2013; Pires et al., 2010; Prediger et al., 2005).

Os estudos clínicos com cafeína e TDAH tiveram início da década de 70, sendo o primeiro estudo avaliando os efeitos benéficos da cafeína em crianças hipercinéticas (Schnackenberg, 1973). Neste estudo, onze crianças cujos sintomas hipercinéticos melhoraram com o metilfenidato, mas que desenvolveram efeitos colaterais, a cafeína foi substituída na forma de uma xícara de café, no café da manhã e outra no almoço. Todos os participantes que beberam café apresentaram melhora dos sintomas similares à utilização do metilfenidato, (menor pontuação em uma escala hiperinesia), porém as crianças não apresentaram efeitos colaterais com a ingestão do café.

Mais tarde alguns autores tentaram reproduzir os resultados de Schnackenberg, avaliando os efeitos da cafeína e dos estimulantes (principalmente metilfenidato e anfetaminas), porém não foi possível reproduzir a eficácia da cafeína (Arnol et al., 1978; Baer, 1987; Conners, 1975, 1979; Garfinkel; Webster; Sloman, 1975, 1981), que foi atribuída a sua dosagem como insuficiente para garantir um bloqueio prolongado dos receptores de adenosina A_{2A}. Além disso, o perfil farmacocinético de cafeína também é diferente em crianças e adolescentes, sendo eliminada mais rapidamente (El-Yazigi et al., 1999). No entanto, outros autores obtiveram resultados superiores com a

caféina. Harvey e Marsh (1978), por exemplo, mostraram que o desempenho nos testes de concentração, recordação de dígitos, coordenação visuomotora foram melhores quando comparado o café versus café descafeinado, ou no tratamento combinado com outros estimulantes contra os estimulantes sozinhos (Garfinkel; Webster; Sloman, 1981; Schechter e Timmons, 1985). Alguns relatos sugerem que pacientes com TDAH consomem mais caféina ainda que já estejam utilizando algum psicoestimulante, a fim de melhorar o estado de alerta e o desempenho cognitivo (revisado por Leon, 2000). É importante ressaltar que o consumo de caféina durante a gravidez não foi associado a uma maior prevalência de crianças diagnosticadas com TDAH (Del-Ponte et al., 2016).

O tratamento com antagonistas de receptores de adenosina em animais SHR melhorou os prejuízos de aprendizagem na tarefa do reconhecimento de objeto (Pires et al., 2009), benefício observado também com o tratamento crônico com a caféina (Pires et al., 2010). Em um estudo recente, os receptores de adenosina A_{2A} presentes nos terminais nervosos frontocorticais apresentaram densidade aumentada nos animais SHR e o tratamento com caféina normalizou esse efeito (Pandolfo et al., 2013). Também foi relatada uma possível associação entre os polimorfismos nos receptores de adenosina A_{2A} e o TDAH em seres humanos (Molero et al., 2013).

Recentemente, houve maior interesse científico no potencial efeito da caféina no tratamento do TDAH, com especial atenção em relação à melhora dos déficits cognitivos associados a esse transtorno, principalmente no modelo animal SHR. De acordo com os autores França et al. (2020) a associação de caféina e exercícios físicos durante a fase da adolescência ou adulta em animais SHR, restaurou a habilidade de discriminação olfativa e melhorou a memória de

reconhecimento. Além disso, a administração de cafeína de forma aguda foi associada com a redução da impulsividade em animais adultos SHR (Leffa et al., 2019). Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente, que ratos adolescentes SHR de ambos os sexos, apresentam hiperlocomoção e distúrbios da memória espacial e de reconhecimento. No entanto, as fêmeas apresentaram pior desempenho na tarefa de memória espacial e aprendizado não associativo, e a ingestão de cafeína desde a infância atenuou alterações comportamentais no modelo do TDAH (Nunes et al., 2018).

Nesse contexto, a hipótese de que a manipulação dos receptores de adenosina A_{2A} pode ser uma nova estratégia terapêutica e/ou adjuvante para o tratamento do TDAH é promissora, uma vez que nem todos os pacientes toleram o tratamento com o metilfenidato.

2 OBJETIVO GERAL

Investigar no modelo animal do TDAH as diferenças entre os sexos no perfil de ansiedade, estabelecer o padrão de desenvolvimento de neurônios cultivados do córtex frontal, bem como as respostas a cafeína e a manipulação farmacológica seletiva dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} .

2.1 Objetivos específicos

In vivo:

- Identificar diferenças sexuais por meio de testes comportamentais que avaliam a ansiedade em animais infantis SHR e WKY;

- Verificar o impacto do tratamento com a cafeína nos comportamentos relacionados a ansiedade em animais infantis SHR e WKY machos e fêmeas;

In Vitro:

- Caracterizar morfometricamente o desenvolvimento da região somatodendrítica e axonal em culturas de neurônios do córtex frontal das linhagens SHR e WKY.
- Avaliar o efeito da cafeína, da manipulação farmacológica seletiva dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} e suas vias de sinalização, sobre o desenvolvimento *in vitro* de neurônios de córtex frontal das linhagens SHR e WKY;

PARTE II

Capítulo 1

Sex differences in the anxiety-related behavior and caffeine effects in infant rats of the Attention Deficit and Hyperactivity Disorder model.

No capítulo 1 apresentamos o manuscrito em preparação.

Sex differences in the anxiety-related behavior and caffeine effects in infant rats of the Attention Deficit and Hyperactivity Disorder model

Catiane B. Alves-Oliveira, Amanda S. Almeida, Ana Carolina L. Machado, Ana Helena L. Faé, Marcus Vinicius S. Lara, Daniela M. Marques and Lisiane O. Porciúncula*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 - anexo, Santana, Porto Alegre – RS, Brazil, 90035-003.

*To whom correspondence should be addressed:

Lisiane O. Porciúncula

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, Bairro Santana

Porto Alegre/RS

Brazil

90035-003.

e-mail.: loporciuncula@yahoo.com

Abstract

Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is frequently accompanied by anxiety, which difficult treatment management in children. Caffeine has been effective against cognitive impairments in ADHD, but few studies were performed exploring its effects in emotional traits of ADHD. We sought to find sex differences in the anxiety profile of infant Spontaneously Hypertensive Rats (SHR, an ADHD animal model) and control strain (Wistar Kyoto rats, WKY) as well as their responses to caffeine. Caffeine (0.3 g/L, drinking water) was administered to pups from their dams from postnatal day 8 (PND) to PND 23. Anxiety profile was evaluated from PND 21 to 23 in the open field (OF), elevated plus-maze (EPM) and light dark box test (LDB). Infant SHR from both sexes showed anxiety-related behavior in all behavioral tests, while female WKY rats were less anxious in the LDB test, revealing sex differences in the anxiety traits. While caffeine had no effect in the anxiety-related behavior and hyperlocomotion, it triggered anxiety in infant females from control strain in the LDB. Both sexes of infant SHR showed hyperlocomotion, but only male SHR had more locomotor activity in the LDB. Our findings allow to explore sex differences in ADHD model in the anxiety and hyperlocomotion in childhood.

Keywords: Attention Deficit Hyperactivity Disorder; Caffeine; Anxiety; Spontaneously Hypertensive Rats; Sex differences;

1. Introduction

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is a neurodevelopmental disorder characterized by persistent patterns of inattention, hyperactivity and impulsivity (Faraone et al., 2015). The prevalence rate is approximately 3–5% worldwide (APA, 2013) and it is estimated that two-thirds of children with ADHD also meet diagnostic criteria for another comorbid disorder (Jensen et al., 2001), which can include one or more comorbid internalizing (e.g. Major Depressive Disorder, Generalized Anxiety Disorder) and/or externalizing (e.g. Oppositional Defiant and Conduct Disorder) symptoms.

Sex differences in the prevalence and presentation of symptoms of ADHD comprise male predominance in a ratio of 2:1 or 3:1 because girls are more likely to present inattentive symptoms than the more potentially disruptive hyperactive/impulsive symptoms (Arnet et al., 2015; Polanczyk et al., 2007; Ramtekkar et al., 2010), which favors underdiagnoses. Besides, girls present greater levels of internalizing symptoms such as anxiety and depression, which might lead to alternative diagnoses (Arnold et al., 1996; Martel et al., 2013; Novik et al., 2006; Ramtekkar et al., 2010).

The onset, clinical course, severity and treatment response of anxiety disorders are sex dependent (Pigott, 2003) and high levels of anxiety symptoms have been associated with academic and social difficulties (Mychailyszyn et al., 2010; Wehmeier et al., 2010). As many as 9.4 % of preschoolers exhibit symptoms of anxiety disorders, and early symptoms are a major risk factor for a later formal diagnosis (Egger et al., 2006).

Although methylphenidate is the first choice of treatment for ADHD (Banaschewski et al., 2006) around 30 % of children will not respond and/or tolerate the treatment (Briars et al., 2016). In addition, children with ADHD and comorbid anxiety had either a poorer response to methylphenidate (Moshe et al., 2012; Pliszka, 1989) or they require a higher dose to derive equivalent benefit (Livingstone et al., 1990) or to derive lesser benefit from treatment (Pliszka, 1989; Taylor et al., 1987). Methylphenidate was reported to trigger anxiety-related behavior in rat adulthood when administered during adolescence (Bolaños et al., 2003; Carlezon et al., 2003; Vendruscolo et al., 2008). However, methylphenidate has no effect on anxiety-related behavior in 6-OHDA mice, another experimental model of ADHD (Bouchatta et al., 2018). Therefore, it is predicted that children diagnosed with ADHD and comorbid anxiety may exhibit less response and an increased prevalence of side effects to methylphenidate.

Caffeine is the most widely used psychostimulant with typically consumed doses acting as a non selective antagonist of adenosine A₁ and A_{2A} receptors in the central nervous system (CNS) (Fredholm et al., 1999). In a double-blind crossover study, caffeine in regular coffee improved performance of children diagnosed with ADHD when compared with placebo or decaffeinated coffee (Harvey et al., 1978). The effects of caffeine have been investigated in animal model of ADHD, which caffeine treatment improved learning impairments in the object recognition task (Pires et al., 2010), spatial learning deficits in water maze tasks (Prediger et al., 2005), caffeine improved spatial working memory impairments of female SHR in the Y-maze test (PND 15–28) and improved the short-term memory of male and female SHR in the object recognition task (PND 15-54) (Nunes et al., 2018). However, the effects of caffeine on anxiety levels in

the animal model of ADHD have not been fully explored. The Spontaneously Hypertensive rats (SHR) are the most widely used animal model of ADHD (Sagvolden, 2000; Sagvolden et al., 2009; Russel, 2011). The anxiety-related behavior exhibited for SHR in relation to normotensive controls Wistar-Kyoto (WKY) has been evidenced in the elevated plus-maze (EPM) and the open-field test (OFT) (Gentsch, 1987; Goto et al., 1993), both studies performed in adult male animals. In earlier ages, either male SHR at postnatal day 24 (PND 24) or both sexes (PND 74) exhibited less anxiety behavior (Ferguson et al., 2005; Tsai et al., 2017). However, the anxiety-related behavior in SHR animals during childhood are still unknown. Of note, studies with infants from the ADHD rat model have potential as a translational preclinical study relevant to the period when diagnosis and initial treatment frequently occurs. In this study, anxiety-like behaviors were evaluated in both sexes of ADHD model, highlighting recent guidelines in experimental studies requiring incorporation of sex as a biological variable (Shansky et al., 2016). Besides, we also evaluated the response to caffeine treatment in both sexes and strains.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Male and female SHR and Wistar-Kyoto rats (WKY) (60–70 days old) were mated within our colony at Federal University of Rio Grande do Sul. Animals were maintained under a 12/12-h light-dark cycle (lights on at 7:00 AM), at constant temperature (22 ± 1 °C) and with free access to food and water. The authors state that all animal experiments and protocols were approved, and they were carried out in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee of Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS Ethical Protocol number

29196), based on the guide for the care and use of laboratory animals from the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The experimental procedures were designed to minimize the number of animals used and their suffering. Moreover, the animals were consistently habituated to being handled by experimenters before behavioral testing.

2.2. Caffeine Treatment

The schedule of caffeine administration, experimental groups, and subsequent behavior were summarized in Fig. 1. After birth, male and female SHR and WKY rats pups from postnatal day 8 (PND 8) up to (PND 23) started to receive caffeine from their dams in the drinking water (0.3 g/L corresponding to moderate intake) (Fredholm et al., 1999). The administration was only during weekdays and in the active period of the animals (dark cycle).

2.3 Behavioral Analysis

OF and EPM were recorded with a video camera positioned above the apparatus and monitored in an adjacent room by an observer blinded to the treatment and strains. Analysis was recorded by means of a computer-operated tracking system (Any-maze, Stoelting, Woods Dale, IL).

2.3.1 Open field task (OF)

At PND 21, each rat was placed in the center of an open-field arena made of a black-painted wood (60 cm diameter, 50 cm high), for the evaluation of both locomotor activity and anxiety-like behavior (Gould et al., 2009). The total traveled distance and time spent in the central and peripheral zone were recorded during 5 min. The open field apparatus was always cleaned after the end of each session performed by each animal.

2.3.2. Elevated plus maze task (EPM)

At PND 22, each rat was tested for anxiety-like behavior in the EPM. The experiments were conducted in a sound-attenuated room and low intensity light (red dim light). The apparatus consisted of two open arms (50 × 10 cm, length × width) and two enclosed (50 × 10 × 40 cm, length × width × height) arms that were separated by a central arena (10 × 10 cm); the height of the maze was 70 cm, made of a black-painted wood. Each rat was individually placed into the maze center facing the open arm and they were left free to explore the apparatus for 5 min (Walf and Frye, 2007). The following parameters were analyzed: time spent and the number of entries in each arm (all four limbs into an arm of the maze), and risk assessment that measures the stretched attendance posture, in which the rat stretches forward and retracts to its original position in the center of the maze.

2.3.3. Light/Dark Box Task (LDB)

At PND 23, rats were evaluated in the light/dark test, which is based on the innate aversion of rodents to brightly illuminated areas (Crawley et al., 1980). The test apparatus consisted of a rectangular acrylic box divided into a small dark chamber (21 × 35 × 41 cm, height × length × width) and a large brightly illuminated chamber (21 × 45 × 41 cm). The lamp (200 lx) was placed 45 cm above the center of the box. An opening 8 × 5 cm (height × length) joined both compartments. Each animal was placed in the light compartment facing away from the opening and allowed to explore the box for 5 min. The latency to enter into the dark compartment, the total time spent in the lit compartment, the number of transitions between compartments (crossings) were manually recorded by experimenters blind to strains and treatments.

2.4. Statistical analysis

Data were expressed as means \pm SEM of animals from 4 different cohorts. Data were analyzed by using Three-way ANOVA with strain, sex and treatment as factors. Tukey's post hoc test was used for multiple comparisons when interaction among factors was detected. Statistical significance was considered for $P < 0.05$. GraphPad Prism version 8.00 was the software used.

4. Results

The body weight gain was recorded at the beginning of caffeine treatment on PND 8 at PND 23. Total weight gain was calculated as: weight gain (g) = final weight – initial weight. Three-way ANOVA showed that caffeine treatment (0.3 g/L), did not modify weight gain in animals both sexes (Fig. 2)

Anxiety-related behavior and locomotor activity were analyzed in the open field arena. It can be observed that SHR from both sexes spent less time in the center [$F(1, 81) = 42.65$; $P < 0.0001$; strain differences], more time in the periphery [$F(1,81) = 43.75$; $P < 0.0001$; strain differences] (Fig. 3 A,C). While travelled distance in the center was similar in both strains (Fig. 3 B), SHR from both sexes increased their traveled distance in the periphery [$F(1,81) = 8.213$; $P = 0.0053$; strain differences] (Fig. 3 D). Caffeine did not modify the behavior in SHR and WKY from both sexes.

In the elevated plus maze (EPM) test was performed to assess anxiety-like behaviors, SHR from both sexes spent less time (%) in the open arms [$F(1,81) = 13.91$; $P = 0.0004$, strain differences] and more time (%) in closed arms [$F(1,81) = 13.91$; $P = 0.0004$; strain differences] (Fig. 4 A,C). Male SHR increased the number of entries in the open arms [$F(1,81) = 6.576$; $P = 0.0122$; strain vs sex] (Fig. 4B), compared to female SHR and males WKY. No differences were found

between strains in the closed arms (Fig. 4D) and risk assessment (Fig. 4E). Caffeine did not modify the behavior in any of the parameters analyzed in both strains.

When anxiety-related behavior was evaluated in the LDB, SHR both sexes spent less time into the light compartment [$F(1,81) = 9.298$; $P = 0.0031$; strain effect] (Fig. 5A), and only female WKY increased latency to enter in the dark compartment [$F(1,81) = 18.09$; $P < 0.0001$, strain effect], (Fig. 5C). Only male SHR presented an increase in the number of crossings when compared to control strain from both sexes (WKY) [$F(1,81) = 13.17$; $P = 0.0005$, strain effect] (Fig. 5C). Besides male SHR presented an increase in the number of risk assessments when compared to control strain from both sexes [$F(1,81) = 18.19$; $P < 0.0001$; strain effect] (Fig. 5D). Caffeine significantly decreased the latency to enter into the dark compartment in female control strain (WKY) [$F(1,81) = 4.223$; $P = 0.0431$, treatment vs strain vs sex effect] (Fig. 5B). Caffeine did not modify the behavior in the other parameters.

5. Discussion

In this study, sex differences were observed in the anxiety-like behavior of infant animals from ADHD model and their response to caffeine treatment. Our findings showed that the hyperlocomotion can be already observed in infants from the ADHD model (Gentsch et al., 1987; Sagvolden et al., 1993). In addition, males showed a slightly more hyperlocomotion than female rats from the ADHD model, as revealed by increasing the number of visits in both arms in the EPM and transitions between chambers in the LDB. Both sexes of the ADHD model (SHR) showed more avoidance to the center of OF and they remained longer in the

closed arms in the EPM, which reveals anxiety-related behavior. The predictable behavior in the EPM consists in greater amounts of visits and time spent in the closed arms, both used as proxies of locomotor activity and natural anxiety behavior, respectively, whereas the same parameters in the open arms correlate with less anxiety (Cruz et al., 1994; File, 1991; Ramos et al., 1997). In addition, both sexes from the ADHD model had entered more rapidly in the dark chamber and presented more aversiveness to the light chamber. Studies have shown that infant animals are less anxious probably because at this age they are more prone to explore the environment during the period that they are leaving the mother nest; thus anxiety-related behavior will develop over time (Doremus et al., 2003; Macri et al., 2002; Smith and Morrell, 2007). In various paradigms the anxious profile of SHR has been attenuated over time (Calzavara et al., 2004; Durand et al., 1999; 2000; Ramos et al., 2002; Söderpalm, 1989); therefore our data revealed that the anxious behavior appeared earlier in infant rats from ADHD model.

Caffeine triggered anxiety in infant female rats from control strain. In fact, caffeine can exert anxiolytic or anxiogenic effects depending on the anxiety test employed, species and sex (Hughes et al., 2016; Rosa et al., 2018). Most importantly, the effects of caffeine in the anxiety profile vary with age, for example, caffeine (1 g/L) administered throughout life attenuated anxiety of adult rats from both sexes (Ardais et al., 2016) and also at relatively lower doses (25 and 50 mg/kg) (Hughes et al., 2014). In rat offspring's (PND 14) caffeine (0.3 g/L) reduced exploratory activity and promoted alterations in spatial patterns of reflex and motor development (Souza et al., 2015). However, caffeine consumption (0.3 g/L) by adolescent male rats (PND 28) increases their anxiety-related behavior in

adulthood, while pubescent female rats that received caffeine (0.3 g/L) throughout life displayed less anxiogenic profile (Sallaberry et al., 2018).

According to studies performed by our group and others caffeine has been effective in preventing various types of memory impairment and also inattention (Nunes et al., 2018; Pandolfo et al., 2013; Pires et al., 2010; Prediger et al., 2005). Regarding sex differences, caffeine was also able to prevent recognition memory impairment in female adolescent SHR, but it worsened hyperactivity (Nunes et al., 2018). The anxiety-related behavior and hyperlocomotion in infants from the ADHD model was not affected by caffeine, which suggests that caffeine could be more effective for cognitive impairments than emotional traits. Of note, the impulsivity displayed by males from the ADHD model was not affected by caffeine treatment (Leffa et al., 2019). Emotionality and cognition are closely related phenomena and rodents are enabled to present adaptive responses when confronted with potentially threatening stimuli, which is critical to their survival.

Regarding sex differences, infant females from control strain showed less anxiety-related behavior than female SHR in the LDB. Even though the performance of each test varies among strains, the light compartment is considered less aversive than open arms in the EPM and center area of the OF (Fraser et al., 2010). Since animal models are useful for understanding the phenotypic sex differences relevant to psychiatric disorders, most of behavioral studies have been focused on male subjects and this difference may be explored considering women prevalence in anxiety-related disorders as a comorbidity in ADHD (Levy et al., 2005). Although acute episodes of anxiety could be beneficial, in chronic conditions anxiety triggers maladaptive or pathological responses that can lead to disturbances of brain homeostasis, our findings revealed an

anticipation of anxiety-related behavior in infant animals from the ADHD model. These findings allow us to examine features of ADHD comorbid with anxiety disorders and the possibility to explore childhood anxiety is emerging as an important issue not only in ADHD, but also in other neuropsychiatric disorders.

Declaration of Interests

All authors declare no financial interests.

Acknowledgments

Funding was supplied by Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and other Brazilian Funding Agencies (CAPES, FAPERGS). Catiane B. Alves de Oliveira, Marcus Vinicius Soares de Lara, Amanda Staldoni Almeida and Daniela Melo Marques are recipient from CNPq fellowship.

Fig. 1

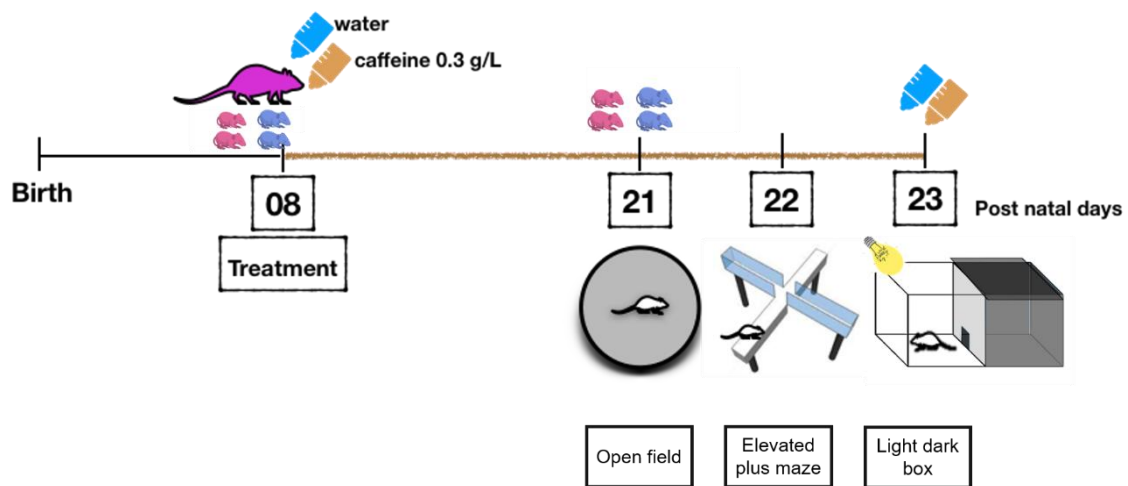


Figure. 1 – Experimental design of caffeine administration in ADHD model (SHR) and their control strain from both sexes. At postnatal day 8 (PND 8) Spontaneously Hypertensive rat (SHR) and Wistar Kyoto rat (WKY) pups started to receive caffeine (0.3 g/L) or drinking water from their dams up to PND 23. Caffeine treatment ended at PND 23. Open field testing was carried out at PND 21, Elevated Plus Maze at PND 22 and Light Dark Box at PND 23.

Fig. 2

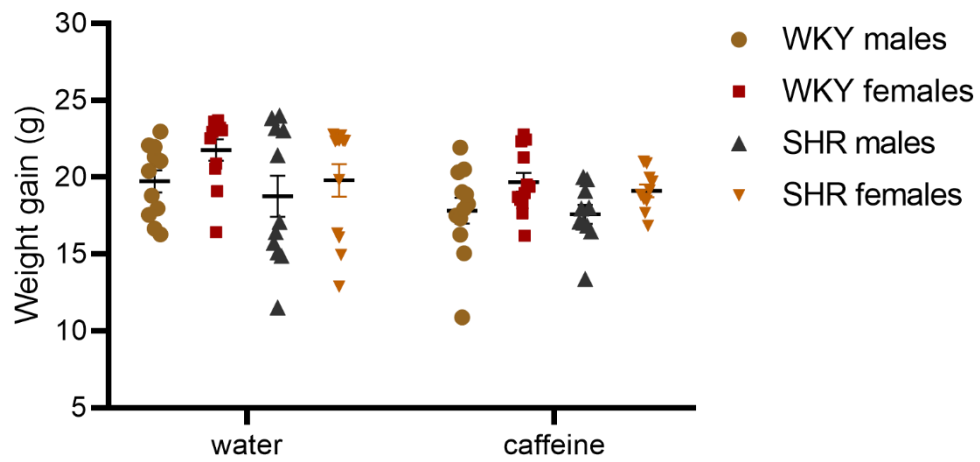


Figure. 2- Effects of caffeine treatment (0.3 g/L) in the body weight gain. Data are shown as mean + S.E.M (n = 10–12 animals per group).

Fig. 3

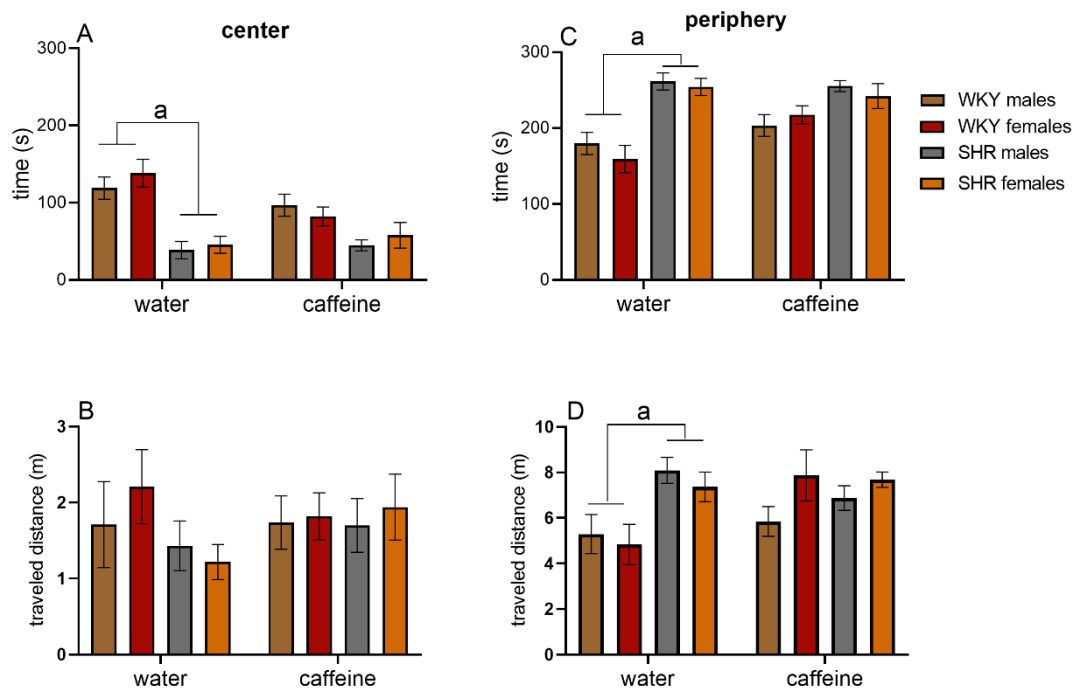


Figure. 3 - Locomotor and anxiety-related behavior of infant rats of both sexes from ADHD model (SHR) and control strain (WKY) after treatment with caffeine (0.3 g/L). Analysis was carried out at PND 21 during five minutes of exploration in the open field arena. Animals started to receive caffeine (caff) from their dams or water (w) only during weekdays and during their active period at PND 8. A - time spent in seconds (s) and B – traveled distance in meters (m) in the center. C - time spent in seconds (s) and D - traveled distance in meters (m) in the periphery. Data are represented as means \pm S.E.M. of 10-12 animals/group. ^aP < 0.05; strain effect; Three-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

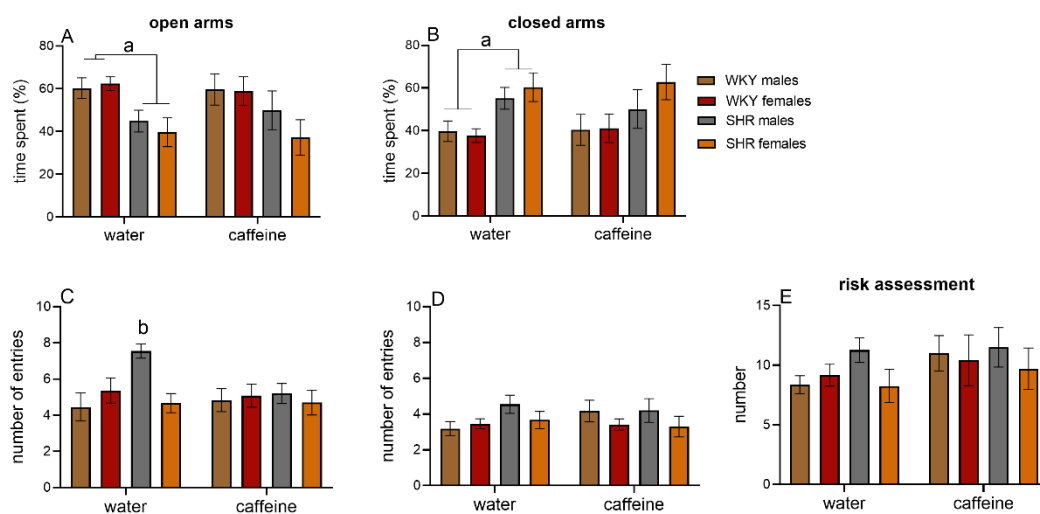
Fig. 4

Figure. 4 - Analysis of locomotor and anxiety-related behavior in the elevated plus maze (EPM) of infant rats of both sexes from ADHD model (SHR) and control strain (WKY) after treatment with caffeine (0.3 g/L). Analysis was carried out at PND 22 during five minutes of exploration in the maze. Animals started to receive caffeine (caff) from their dams or water (w) only during weekdays and during their active period at PND 8. A – time in seconds (s) and B – number of entries in the open arms. C - time in seconds (s) and D – number of entries in the closed arms. E - number of risk assessment. Data are represented as means \pm S.E.M. of 10-12 animals/group. ^aP < 0.05; strain effect; ^bP < 0.05; strain vs sex interaction; Three-way ANOVA.

Fig. 5

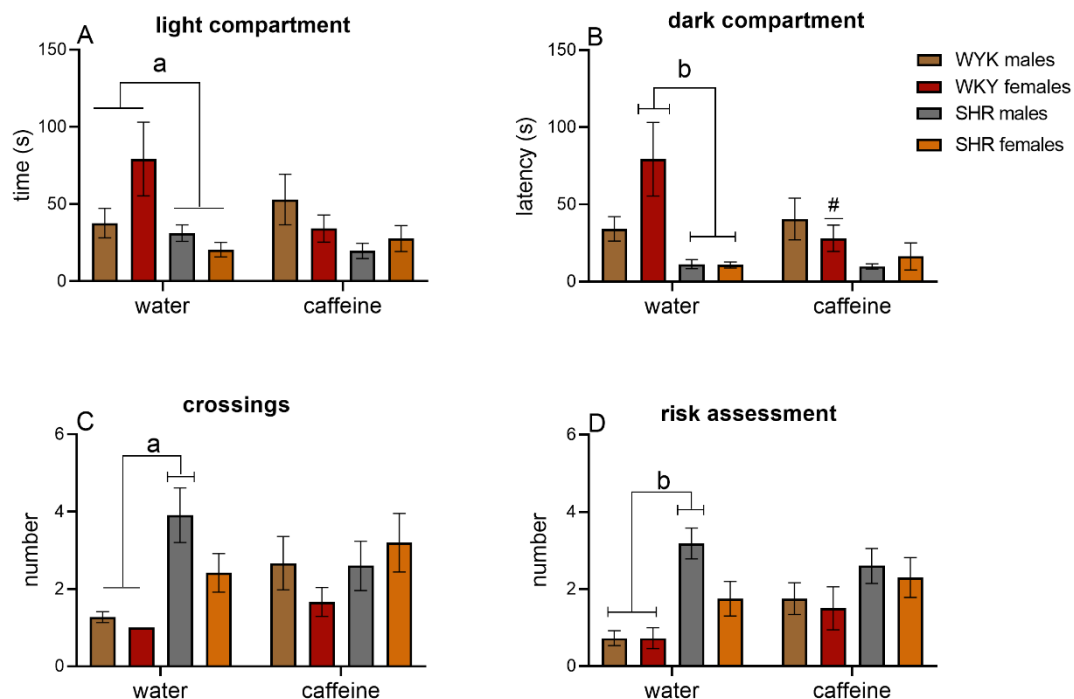


Figure. 5 - Analysis of locomotor and anxiety-related behavior in the light dark box (LDB) of infant rats of both sexes from ADHD model (SHR) and control strain (WKY) after treatment with caffeine (0.3 g/L). Analysis was carried out at PND 23 during five minutes of exploration in the maze. Animals started to receive caffeine (caff) from their dams or water (w) only during weekdays and during their active period at PND 8. A- time spent in seconds (s) in the light compartment; B – latency in seconds (s) to enter in the dark compartment; C – number of crossings between compartments (light and dark); D – risk assessment; Data are represented as means \pm S.E.M. of 10 - 12 animals/group. ^aP < 0.05; strain effect; ^bP < 0.05; treatment effect; ^cP < 0.05; treatment vs strain vs sex interaction; [#]P < 0.05; interaction between sex and strain or sex and treatment; Three-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test.

References

- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. BMC Med. 17 (2013) 133-137.
- Ardais, A. P., Rocha, A. S., Borges, M. F., Fioreze, G. T., Sallaberry, C., S., Mioranza, Nunes, F., Pagnussat, N., Botton, P. H., Cunha, R. A., Porciúncula, L. O. Caffeine exposure during rat brain development causes memory impairment in a sex selective manner that is offset by caffeine consumption throughout life, Behav. Brain Res. 303 (2016) 76-84. doi: 10.1016/j.bbr.2016.01.026.
- Arnold, L. E. Sex Differences in ADHD: Conference Summary, Journal of Abnormal Child Psychology 24 (1996) 555–569.
- Arnett, A. B., Pennington, B. F., Willcutt, E. G., Defries, J. C., Olson, R. K. Sex Differences in ADHD Symptom Severity, Journal of Child Psychology and Psychiatry 56 (2015) 632–639. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12337>.
- Banaschewski, T., Zuddas, A., Faraone, S. V., Sergeant, J. Long-Acting Medications for the Hyperkinetic Disorders, European Child & Adolescent Psychiatry 15 (2006) 476–495. <https://doi.org/10.1007/s00787-006-0549-0>.
- Bolaños, C. A., Barrot, M., Berton, O., Wallace-Black, D., Nestler, E. J. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood, Biol. Psychiatry 54 (2003) 1317–1329. DOI: 10.1016/s0006-3223(03)00570-5
- Bouchatta, O., Manouze, H., Bouali-Benazzouz, R., Kerekes, N., Ba-M'hamed, S., Fossat, P., Landry, M., Bennis, M. Neonatal 6-OHDA lesion model in mouse

induces Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder (ADHD)-like behavior, *Sci. Rep.* 8 (2018) 15349. doi: 10.1038/s41598-018-33778-0.

Briars, L., Todd, T. A Review of Pharmacological Management Of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 21 (2016) 192–206.

Calzavara, M. B., Lopez, G. B., Abílio, V. C., Silva, R. H., Frussa-Filho, R. Role of anxiety levels in memory performance of spontaneously hypertensive rats, *Behav. Pharmacol.* 15 (2004) 545-553.

Carlezon Jr, W. A., Mague, S. D., Andersen, S. L. Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats, *Biol. Psychiatry* 54 (2003) 1330–1337. DOI: 10.1016/j.biopsych.2003.08.020

Crawley, J. N., Goodwin, F. K. Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 (1980) 167-170. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90067-2)

Cruz, A. P. M., Frei, F., Graeff, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49 (1994) 171–176.

Doremus, T. L., Brunell, S. C., Varlinskaya, E. I., Spear, L. P. Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats, *Pharmacol. Biochem, Behav.* 75 (2003) 411–418.

Durand, M., Berton, O., Aguerre, S., Edno, L., Combourieu, I., Mormède, P., Chaoulhoff, F. Effects of repeated fluoxetine on anxiety-related behaviours, central serotonergic systems, and the corticotropic axis in SHR and WKY rats, *Neuropharmacology* 38 (1999) 893-907.

Durand, M., Aguerre, S., Fernandez, F., Edno, L., Combourieu, I., Mormede, P., Chaoulhoff, F. Strain-dependent neurochemical and neuroendocrine effects of

desipramine, but not fluoxetine or imipramine, in spontaneously hypertensive and Wistar–Kyoto rats, *Neuropharmacology* 39 (2000) 2464– 77.

Egger, H. L., Angold, A. Common Emotional and Behavioral Disorders in Preschool Children: Presentation, Nosology, and Epidemiology, *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 47 (2006) 313–337. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2006.01618.x>.

Faraone, S. V., Asherson, P., Banaschewski, T., Biederman, J., Ramos-Quiroga, J. A., Rohde, L. A., Tannock, R., Franke, B. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, *Nat. Rev. Dis. Primers* 1 (2015) 15020. doi: 10.1038/nrdp.2015.20. 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.20>

Ferguson, S. A., Gray, E. P. Aging Effects on Elevated plus Maze Behavior in Spontaneously Hypertensive, Wistar – Kyoto and Sprague – Dawley Male and Female Rats, *Physiology & Behavior* 85 (2005) 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.06.009>.

File, S. E. The biological basis of anxiety, in: H.Y. Meltzer, D. Nerozzi, (Eds.), *Current Practices and Future Developments in the Pharmacotherapy of Mental Disorders*, Elsevier, Amsterdam, 1991, pp. 159–165.

Fraser, L. M., Brown, R. E., Hussin, A., Fontana, M., Whittaker, A., O'Leary, T. P., Lederle, L., Holmes, A., Ramos, A. Measuring anxiety and locomotion-related behaviours in mice: a new way of using old tests, *Psychopharmacology (Berl)*. 211 (2010) 99-112. doi: 10.1007/s00213-010-1873-0.

Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., Zvartau, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use, *Pharmacol. Rev.* 51(1999) 83-133.

Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Feer, H. Open field and elevated plus-maze: a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide, *Behav. Brain Res.* 25 (1987) 101-107. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(87\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0166-4328(87)90003-9)

Goto, S. H., Conceição, I. M., Ribeiro, R. A., Frussa-Filho, R. Comparison of anxiety measured in the elevated plus-maze, open-field and social interaction tests between spontaneously hypertensive rats and Wistar EPM-1 rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26 (1993) 965-969.

Gould, T. D., Dao, D. T., Kovacsics, C. E. The Open Field Test, in: *Mood and Anxiety-Related Phenotypes in Mice*. In Humana Press, 2009, 42 pp. 1–20. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9>.

Harvey, A. H. P., Marsh, R. W. The Effects of De-Caffeinated Coffee versus Whole Coffee on Hyperactive Children, *Develop. Med. Child Neurol.* 20 (1978) 81–86.

Hughes, R. N., Hancock, N. J., Henwood, G. A., Rapley, S. A. Evidence for Anxiolytic Effects of Acute Caffeine on Anxiety-Related Behavior in Male and Female Rats Tested with and without Bright Light, *Behavioural Brain Research* 271 (2014) 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.038>.

Hughes, R. N., Hancock, N. J. Strain-dependent effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in PVG/c, Long-Evans and Wistar rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 140 (2016) 51-61. doi: 10.1016/j.pbb.2015.11.005

Jensen, P. S., Hinshaw, S. P., Kraemer, H. C., Lenora, N., Newcorn, J. H., Abikoff, H. B. H. B., March, J. S., Arnold, L. E., Cantwell, D. P., Conners, C. K., Elliott, G. R., Greenhill, L. L., Hechtman, L., Hoza, B., Pelham, W. E., Severe, J. B., Swanson, J. M., Wells, K. C., Wigal, T., Vitiello, B. ADHD Comorbidity

Findings From the MTA Study : Comparing Comorbid Subgroups, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 40 (2001) 147-158.

Leffa, D. T., Ferreira, S. G., Machado, N. J., Souza, C. M., Rosa, F. D., de Carvalho, C., Kincheski, G. C., Takahashi, R. N., Porciúncula, L. O., Souza, D. O., Cunha, R. A., Pandolfo, P. Caffeine and cannabinoid receptors modulate impulsive behavior in an animal model of attentional deficit and hyperactivity disorder, *Eur. J. Neurosci.* 49 (2019)1673-1683. doi: 10.1111/ejn.14348.

Levy, F., Hay, D. A., Bennett, K. S., McStephen, M. Gender differences in ADHD subtype comorbidity, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 44 (2005) 368-376. DOI: 10.1097/01.chi.0000153232.64968.c1

Livingstone, R. L., Dykman, R. A., Ackerman, P.T. Psychiatric comorbidity and response to two doses of methylphenidate in children with attention deficit disorder, *Child Adolesc. Psychopharmacol.* 2 (1990) 115-122.

Macri, S., Adriani, W., Chiarotti, F., Laviola, G. Risk taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice, *Animal Behaviour* 64 (2002) 541–546.

Martel, M. M. Sexual Selection and Sex Differences in the Prevalence of Childhood Externalizing and Adolescent Internalizing Disorders, *Psychological Bulletin* 139 (2013) 1221–1259. <https://doi.org/10.1037/a0032247>.

Moshe, K., Karni, A., Tirosh, E. Anxiety and methylphenidate in attention deficit hyperactivity disorder: a double-blind placebo-drug trial. *Atten. Defic. Hyperact. Disord.* 4 (2012) 153-158. doi: 10.1007/s12402-012-0078-2.

Mychailyszyn, M. P., Méndez, J. L., Kendall, P.C. School Functioning in Youth With and Without Anxiety Disorders : Comparisons by Diagnosis and Comorbidity, *Scholl Psychology Review* 39 (2010) 106–121.

Novik, T. S., Hervas, A., Ralston, S. J., Pereira, R. R., Lorenzo, M. J. Influence of Gender on Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder in Europe – ADORE, *European Child & Adolescent Psychiatry* 15 (2006) 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00787-006-1003-z>.

Nunes, F., Pochmann, D., Almeida, A. S., Marques, D. M., Porciúncula, L. O. Differential Behavioral and Biochemical Responses to Caffeine in Male and Female Rats from a Validated Model of Attention Deficit and Hyperactivity Disorder, *Mol Neurobiol.* 55 (2018) 8486-8498. doi: 10.1007/s12035-018-1000-5.

Pandolfo, P., Machado, N. J., Köfalvi, A., Takahashi, R. N., Cunha, R. A. Caffeine regulates frontocostriatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23(2013):317-328. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.04.011.

Pigott, T. A. Anxiety disorders in women, *Psychiatr. Clin. North Am.* 26 (2003) 621-672, vi-vii.

Pires, V. A., Pamplona, F. A., Pandolfo P., Prediger, R. D., Takahashi, R. N. Chronic caffeine treatment during prepubertal period confers long-term cognitive benefits in adult spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), *Behav. Brain Res.* 2010; 215(1):39-44. doi: 10.1016/j.bbr.2010.06.022.

Pliszka, S.R. Effect of anxiety on cognition, behavior and stimulant response in ADHD, *Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 28 (1989) 882-887.

Polanczyk, G., de Lima, M. S., Horta, B. L., Biederman, J., Rohde, L. A. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis, *Am. J. Psychiatry* 164 (2007) 942-948.

Prediger, R. D., Pamplona, F. A., Fernandes, D., Takahashi, R. N. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) - the spontaneously hypertensive rat (SHR), *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 8 (2005) 583-594.

Ramos, A., Berton, O., Mormede, P., Chaoulhoff, F. A multiple test study of anxiety related behaviours in six inbred rat strains, *Behav. Brain Res.* 85 (1997) 57–69.

Ramos, A., Kangerski, A. L., Basso, P. F., Da Silva Santos, J. E., Assreuy, J., Vendruscolo, L. F., Takahashi, R. N. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain, *Behav. Brain Res.* 12 (2002) 113-123.

Ramtekkar, U. P., Reiersen, A. M., Todorov, A. A., Todd, R. D. Disorder Symptoms and Diagnoses, *JAACAP* 49 (2010) 217–228.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.jaac.2009.11.011>.

[52] Rosa, L. V., Ardais, A. P., Costa, F. V., Fontana, B. D., Quadros, V. A., Porciúncula, L. O., Rosemberg, D. B. Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 165 (2018) 1-8. doi: 10.1016/j.pbb.2017.12.002.

Russell, V. A. Overview of Animal Models of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), *Curr. Protoc. Neurosci.* 9 (2011) 1–9.
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0935s54>.

Sagvolden, T. Behavioral Validation of the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) as an Animal Model of Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder (AD / HD), *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24 (2000) 31–39.

Sagvolden, T., Johansen, E. B., Wøien, G., Walaas, S. I., Storm-Mathisen, J., Bergersen, L. H., Hvalby, O., Jensen, V., Aase, H., Russell, V. A., Killeen, P.R., Dasbanerjee, T., Middleton, F. A., Faraone, S. V. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD - the importance of selecting the appropriate reference strain, *Neuropharmacology* 57 (2009) 619-626. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.08.004.

Sagvolden, T., Pettersen, M. B., Larsen, M. C. Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesis: SHR behavior compared to four other rat strains, *Physiology & Behavior* 54 (1993) 1047–1055. doi:10.1016/0031-9384(93)90323-8

Sallaberry, C., Ardais, A. P., Rocha, A., Borges, M. F., Fioreze, G. T., Mioranza, S., Nunes, F., Pagnussat, N., Botton, P. H. S., Porciúncula, L. O. Sex differences in the effects of pre- and postnatal caffeine exposure on behavior and synaptic proteins in pubescent rats, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 81 (2018) 416-425. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.08.015.

Shansky, R. M., Woolley, C. S. Considering Sex as a Biological Variable Will Be Valuable for Neuroscience Research, *J. Neurosci.* 36 (2016) 11817-11822. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1390-16.2016

Smith, K. S., Morrell, J. I. Comparison of infant and adult rats in exploratory activity, diurnal patterns, and responses to novel and anxiety-provoking environments, *Behav. Neurosci.* 121 (2007) 449-461.

Söderpalm, B. The SHR exhibits less "anxiety" but increased sensitivity to the anticonflict effect of clonidine compared to normotensive controls, *Pharmacol. Toxicol.* 65 (1989) 381-386.

Souza, A. C., Souza, A., Medeiros, L. F., De Oliveira, C., Scarabelot, V. L., Da Silva, R. S., Bogo, M. R., Capiotti, K. M., Kist, L. W., Bonan, C. D., Caumo, W., Torres, I. L. Maternal caffeine exposure alters neuromotor development and hippocampus acetylcholinesterase activity in rat offspring, *Brain Res.* 1595 (2015) 10-18. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.039.

Taylor, E., Schachar, R., Thorley, G., Wieselberg, H.M., Everitt, B., Rurrer, M. Which boys respond to stimulant medication? A controlled trial of MPH in boys with disruptive behavior. *Psychol. Med.* 17 (1987) 121-143.

Tsai, M., Koz, A., Li, Y., Shen, W., Chih, A., Huang, W. Social Factors affect Motor and Anxiety Behaviors in the Animal Model of Attention Deficit Hyperactivity Disorders: A Housing-Style Factor, *Psychiatry Research* 254 (2017) 290–300. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.05.008>.

Vendruscolo, L. F., Izídio, G. S., Takahashi, R. N., Ramos, A. Chronic methylphenidate treatment during adolescence increases anxiety-related behaviors and ethanol drinking in adult spontaneously hypertensive rats, *Behav. Pharmacol.* 19 (2008) 21-27. doi: 10.1097/FBP.0b013e3282f3cfbe.

Walf, A. A., Frye, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 322-328.

Wehmeier, P. M., Schacht, A., Barkley, R. A. Social and Emotional Impairment in Children and Adolescents with ADHD and the Impact on Quality of Life, *Journal of Adolescent Health* 46 (2010) 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2009.09.009>.

Capítulo 2

Caffeine and adenosine A_{2A} receptors rescue neuronal development *in vitro* of frontal cortical neurons in a rat model of Attention Deficit and Hyperactivity Disorder

Artigo publicado no periódico *Neuropharmacology*

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107782>



Caffeine and adenosine A_{2A} receptors rescue neuronal development *in vitro* of frontal cortical neurons in a rat model of attention deficit and hyperactivity disorder

Catiane B. Alves, Amanda S. Almeida, Daniela M. Marques, Ana Helena L. Faé,
Ana Carolina L. Machado, Diogo L. Oliveira, Luis Valmor C. Portela, Lisiane O. Porciúncula*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Anexo, Santana, Porto Alegre, RS, Brazil, 91003-003

**Caffeine and adenosine A_{2A} receptors rescue neuronal development
in vitro of frontal cortical neurons in a rat model of Attention Deficit and
Hyperactivity Disorder**

Catiane B. Alves, Amanda S. Almeida, Daniela M. Marques, Ana Helena L. Faé,
Ana Carolina L. Machado, Diogo L. Oliveira, Luis Valmor Cruz Portela, Lisiane
O. Porciúncula*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 - anexo,
Santana, Porto Alegre – RS, Brazil, 90035-003.

*To whom correspondence should be addressed:

Lisiane O. Porciúncula

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 –anexo, Bairro Santana

Porto Alegre/RS

Brazil

90035-003.

e-mail.: loporciuncula@yahoo.com

Abstract

Although some studies have supported the effects of caffeine for treatment of Attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD), there were no evidences about its effects at the neuronal level. In this study, we sought to find morphological alterations during *in vitro* development of frontal cortical neurons from Spontaneously hypertensive rats (SHR, an ADHD rat model) and Wistar-Kyoto rats (WKY, control strain). Further, we investigated the effects of caffeine and adenosine A₁ and A_{2A} receptors (A₁R and A_{2A}R) signaling. Cultured cortical neurons from WKY and SHR were analyzed by immunostaining of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and tau protein after treatment with either caffeine, or A₁R and A_{2A}R agonists or antagonists. Besides, the involvement of PI3K and not PKA signaling was also assessed. Neurons from ADHD model displayed less neurite branching, shorter maximal neurite length and decreased axonal outgrowth. While caffeine recovered neurite branching and elongation from ADHD neurons via both PKA and PI3K signaling, A_{2A}R agonist (CGS 21680) promoted more neurite branching via PKA signaling. The selective A_{2A}R antagonist (SCH 58261) was efficient in recovering axonal outgrowth from ADHD neurons through PI3K and not PKA signaling. For the first time, frontal cortical neurons were isolated from ADHD model and they presented disturbances in the differentiation and outgrowth. By showing that caffeine and A_{2A}R may act at neuronal level rescuing ADHD neurons outgrowth, our findings strengthen the potential of caffeine and A_{2A}R receptors as an adjuvant for ADHD treatment.

Keywords.: Attention Deficit Hyperactivity Disorder; caffeine; adenosine; neurons; axons; dendrites; neuronal development.

1. Introduction

Attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) is the most prevalent psychiatric disorder in children and adolescents, which is characterized primarily by a triad of symptoms that include hyperactivity, inattention and impulsivity (Biederman and Faraone, 2005). According to meta-analysis studies, ADHD is a neurodevelopmental disorder with an estimated prevalence of 3.4% in children and adolescents worldwide (Polanczyk et al., 2015).

There is now compelling evidences from neuroimaging studies that children with ADHD follow a similar sequential pattern of cortical development, but they showed a delay as much as 2–3 years, depending upon the specific cortical region (Shaw et al., 2007; 2012). Neuroimaging studies revealed reductions in the volume of brain areas with predominant dopaminergic innervation, leading to deficits in cognitive processing, attention, motor planning, speed of processing responses, and other behavioral issues observed in ADHD (Biederman et al., 2005; Castellanos et al., 2002; 2006; Cortese, 2012; Hoogman et al., 2017). The prefrontal cortex (PFC), caudate and cerebellum have also emerged as the primary areas showing deficits in ADHD, since they support a host of cognitive functions such as executive and attentional control, evaluation of reward contingencies and working memory (Andrew et al., 2009; Duan et al., 2018; Ernst et al., 2002; Martinussen et al., 2005).

Caffeine is a non-selective antagonist of adenosine A₁ (A₁R) and A_{2A} (A_{2A}R) receptors being the most consumed psychostimulant worldwide (Fredholm et al., 1999). We and others have provided evidences about the potential of chronic caffeine to improve cognitive performance in tasks requiring

attention and memory (Angelucci et al., 1999; Borota et al., 2014; Costa et al., 2008a). In addition, caffeine was also described to prevent memory impairment associated to aging and neurodegenerative disorders (Costa et al., 2008b; Espinosa et al., 2013; Laurent et al., 2014; Sallaberry et al., 2013). In previous studies from our group and others, caffeine has been described to improve cognitive performance in tasks requiring attention and memory (Angelucci et al., 1999; Borota et al., 2014; Costa et al., 2008a), but it is also able to prevent memory impairment associated to aging and neurodegenerative disorders (Costa et al. 2008b; Espinosa et al., 2013; Laurent et al., 2014; Sallaberry et al., 2013). Despite having some studies addressing the effects of caffeine during periods of brain development (Ardais et al., 2014; Mioranza et al., 2014; Silva et al., 2013), it is relatively recent the role of adenosine receptors in these processes (Canals et al., 2005; Ribeiro et al., 2016; Rodrigues et al., 2018) or developmental disorders (Ferré et al., 2018).

The potential of caffeine as a treatment and/or a second line of treatment for ADHD was previously reported with conflicting data, some reporting efficacy in relieving symptoms related to ADHD in a subgroup of patients (Garfinkel et al., 1981; Harvey et al., 1978; reviewed in Ioannidis et al., 2014), while others have failed to find superior effects when compared to the first line of treatment (Firestone et al., 1978; Leon, 2000). Importantly, there was no association between maternal caffeine consumption during pregnancy and increased prevalence of ADHD in children (Del-Ponte et al., 2016). In ADHD patients, one study suggested that ADORA2A gene may be involved in ADHD traits (Molero et al., 2013), and interaction of ADORA2A and dopamine DRD2 genes may play a role in the anxiety as a comorbidity of the ADHD (Fraporti et al., 2019).

In experimental studies, caffeine was described to be effective against memory impairment and inattention (Caballero et al., 2011; Nunes et al., 2018; Pandolfo et al., 2013; Pires et al., 2010; Prediger et al., 2005a), which were further characterized being through A_{2A}R antagonism in the ADHD rat model (Pires et al., 2009; Prediger et al., 2005b). In contrast to many studies on behavioral findings in ADHD rat model, there are not available data exploring the pattern of *in vitro* neuronal development, which certainly could contribute for the understanding of ADHD neurobiology. Alterations in the axonal morphology and dendritic branching can alter brain connectivity and both are implicated in a wide range of neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders (Bakhshi and Chance, 2015; Kaufmann et al., 1997; Mukaetova-Ladinska et al., 2004; Shelton et al., 2015). Of note, caffeine and adenosine receptor in ADHD model have been mostly investigated at the behavioral level, with more scarce studies exploring at cellular or molecular level (Nunes et al., 2018; Pandolfo et al., 2013).

To our knowledge, the effects of caffeine and adenosine receptors have not yet been examined in neurons isolated from ADHD rat model. We therefore sought to identify differences in the neuronal outgrowth in the most validated rat model for ADHD studies (Russell, 2011). We hypothesized that frontal cortical neurons from ADHD rat model could present a distinct pattern of neuronal outgrowth. Then, we investigated the effects of caffeine, A₁R and A_{2A}R and signaling pathways involved in neuronal outgrowth in frontal cortical neurons of ADHD model. Our findings demonstrated that disturbances in the neuronal outgrowth were observed in frontal cortical neurons from ADHD model and they were rescued by caffeine and signaling pathways operated by either A_{2A}R or involved in neuronal development processes.

2. Material and methods

2.1. *Animals*

Pregnant SHR (NCrl) and Wistar-Kyoto rats (WKY/NlcoCrl) were obtained from Federal University of Rio Grande do Sul. Animals were maintained under 12/12h light-dark cycle (lights on at 7:00 AM), at constant temperature (22 ± 1 °C) and with free access to food and water. The authors state that all animal experiments and protocols were approved and they were carried out in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee of Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS Ethical Protocol number 29196), based on the guide for the care and use of laboratory animals from the National Institutes of Health (Publication No. 85-23, revised 1996). The experimental procedures were designed to minimize the number of animals used and their suffering.

2.2. *Chemicals, reagents and antibodies.*

CGS 21680, SCH 58261, DPCPX, CPA and KT 5720 PKA (cAMP-dependent kinase protein) inhibitor were purchased from TOCRIS (São Paulo/SP Brasil). Caffeine and dimethyl sulfoxide (DMSO) (purchased from Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil) and PI3K (phosphoinositide 3-kinase) inhibitor LY294002 (Cell Signaling, São Paulo/SP, Brasil). The primary antibodies used were mouse anti-MAP-2 (sc-74421), goat anti-A_{2A} receptor (sc-32261), goat anti-GAPDH (sc-20357) and mouse anti- β -tubulin (sc-53140) (Santa Cruz Biotechnologies, São Paulo/SP, Brasil), chicken anti-tau (ab-75714) and rabbit

anti-A₁ receptor (ab-82477) (Abcam, São Paulo/SP, Brasil) and DAPI (D1306) (Molecular Probes, São Paulo/SP, Brasil).

2.3. Isolation of frontal cortical neurons from Wistar Kyoto (WKY) and SHR rats

Frontal cortical neurons were isolated from 16-17-day-old WKY and SHR embryos. Pregnant females from both strains were anesthetized with isoflurane before obtaining embryos and then killed by decapitation. They were simultaneously used for obtaining frontal cortical neurons. Briefly, frontal cortex was dissected out and meninges were removed in Krebs buffer placed in Ca²⁺ and Mg²⁺-free Krebs buffer (mM): NaCl, 120; KCl, 4.8; KH₂PO₄, 1.2; glucose, 13; HEPES, 10 (pH 7.4) and 0.3 % bovine serum albumin (BSA). Frontal cortex was dissected out and minced separately into small pieces, which were further digested with trypsin (0.125 %) for 10 minutes at 37° C. The digestion was stopped in a Krebs buffer solution containing 10 % fetal bovine serum (FBS) and 0.004 % DNase I (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP). The tissue was centrifuged at 140 × g for 5 min and the resulting pellet was mechanically dissociated through a 1 ml tip in Krebs solution containing DNase I. Then, cells were centrifuged again and the pellet was resuspended in Neurobasal medium containing supplemented with 2 % B27 (Gibco, Biogen São Paulo/SP, Brazil), 0.5 mM glutamine (Gibco, Biogen São Paulo/SP, Brazil) and plated onto poly-L-lysine-coated 6 well plates or 12 mm² coverslips (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brazil) placed in 24-well plates, in a humid atmosphere of 95 % air and 5 % CO₂. For morphometric analysis experiments, cells were plated at a density of 0.25 × 10⁶ cells/mL in coverslips, and at a density of 1.5 × 10⁶ cells/mL in 6-well plates.

2.4. Treatments

Neuronal *in vitro* development was assessed at 2 and 5 days *in vitro* (DIV). At 1 or 4 DIV, neurons were incubated 24 h in the presence of either 100 nM CPA, or 50 nM CGS 21680 (A₁R and A_{2A}R agonists, respectively), or 50 nM DPCPX, SCH 58261 (A₁R and A_{2A}R antagonists, respectively) or caffeine (30 μM). Caffeine at this concentration acts selectively on A₁R and A_{2A}R receptors (Fredholm et al., 1999). The concentrations chosen for adenosine selective agonists and antagonists were based on previous studies (Canas et al., 2009; Rebola et al., 2005). The inhibitors used were either phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor (0.5 μM LY 294002) or cAMP-dependent kinase protein (PKA) inhibitor (50 μM KT 5720), each one added 30 min prior to the addition of drugs aforementioned and their effects assessed after 24 hours of incubation. Drugs were diluted either in culture medium or DMSO as a vehicle at final concentration of 0.002%.

2.5. Immunocytochemistry

Cultured frontal cortical neurons from both strains grown in 12 mm coverslips. After removing culture medium, cells at 2 and 5 DIV were rinsed with pre-warmed phosphate-buffered saline (PBS) (mM): (NaCl 137; KCl 2.1; KH₂PO₄ 1.8; Na₂HPO₄·2H₂O 10), pH=7.4. After fixation with 4 % phosphate-buffered paraformaldehyde (PFA) solution at 37 °C for 15 min, cells were rinsed with PBS and then incubated during 1 h at room temperature in blocking buffer (PBS containing 1 % BSA, 5 % normal goat serum NGS and 0.2 % Triton X-100). Cells were incubated overnight at 4 °C in a humid chamber with mouse anti-MAP-2 monoclonal antibody (1:1000; Santa Cruz Biotechnologies, São Paulo/Brazil) or

chicken anti-tau monoclonal antibody (1: 1000; Abcam, São Paulo/SP, Brazil) diluted in the blocking buffer. After primary antibody incubation, cells were rinsed three times with PBS and incubated with goat anti-mouse IgG conjugated antibody to Alexa 594 or goat anti-IgY secondary antibody of chicken conjugated to Alexa 555 (1: 1000; Invitrogen, São Paulo/Brazil) for 2 h at room temperature protected from light. After three washes in PBS, cultured neurons were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (0.001 %, Invitrogen, São Paulo/Brazil) for 10 minutes. The coverslips were mounted on microscopy slides with fluorescence mounting medium (Dako, São Paulo/Brazil) and visualized on the NIKON eclipse E600 microscope (MAP-2 images) and captured on the FV1000 spectral confocal microscope using the 40 x objective.

2.6. Morphometric analysis

The images of neurons were analyzed with the aid of standard fluorescence microscopy. Neurons were immunostained for the neuronal marker MAP-2 (microtubule associated protein 2), protein found mainly in the somatodendritic region of the neurons. As depicted in the Fig. 1, the following parameters in each neuron were analyzed by using ImageJ software: (A) number of branch points (total number of ramification points in all processes from a single neuron); (B) number of roots (number of primary neurites, i.e., the ones that originate from the cell body); (C) total neurite length (sum of all individual process lengths) and (D) maximum neurite length (the length of the longest process). Morphological analysis was taken into account minimal contact between neurons in order to minimize neurites overlap. The analysis of axonal tau protein immunoreactivity of the frontal cortex neurons at DIV 5 was performed by

fluorescence intensity and expressed as arbitrary units of fluorescence (immunofluorescence a.u).

2.7. Immunoblotting

Samples from cultured frontal cortical neurons of SHR and WKY strains plated on 6 wells dish were processed for A₁R and A_{2A}R immunocontent. At 5 DIV, culture medium was removed and cells were rinsed 3 times in pre-warmed PBS. Cells were gently scraped in 5% SDS (sodium dodecyl sulfate) with 0.1% phosphatase and protease inhibitors (Sigma-Aldrich, São Paulo/SP Brazil) and immediately stored at -20 °C. Total protein quantification was determined by the bicinchoninic acid assay (BCA, Pierce, São Paulo/Brazil), using BSA as standard (Sigma-Aldrich, São Paulo / Brazil). Samples from 5 µg of protein were applied and separated on polyacrylamide gel by SDS-PAGE (12 % running gel). After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham, São Paulo/SP, Brazil) and blocked with Tris buffer containing 5 % milk and 0.1 % Tween-20 (TBS-T) during 1h at room temperature. The nitrocellulose membranes (Amersham, São Paulo/SP, Brazil) were then incubated overnight at 4 °C with polyclonal primary antibody goat anti-A_{2A}R (1: 5000; Santa Cruz Biotechnologies, São Paulo/SP, Brazil) or anti-A₁R (1: 5000; Affinity Bioreagents, São Paulo/SP, Brazil) overnight at 4 °C. The membranes were rinsed with TBS-T and incubated with their respective secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) for 2 h at room temperature. Membranes were developed with chemiluminescent ECL substrate (Amersham, São Paulo/SP, Brazil). Densitometric analyses were performed using the NIH ImageJ software after images acquisition in the ImageQuant LAS 4000

(Amersham, São Paulo/Brazil). After stripping, as a loading control membranes were incubated with goat anti-GAPDH (1:5000) or mouse anti- β -tubulin (1:10000; Santa Cruz Biotechnologies, São Paulo/SP, Brazil).

2.8. Statistical analysis

Data were expressed as means \pm SEM from n independent cultures. Morphometric analysis in each culture was performed from 40 up to 70 individual cells, where all conditions were tested in each culture. Data were analyzed by using Unpaired Student's t test or two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Statistical significance was considered for $P < 0.05$. GraphPad Prism version 6.00 was the software used.

3. Results

3.1. Frontal cortical neurons from ADHD model displayed less differentiation patterns

Cultured frontal cortical neurons from both strains were immunostained for MAP-2 during their development *in vitro*. Somatodendritic analysis was carried out evaluating the number of branch points, roots and maximal and total neurite length (Fig. 2B-E, Panel A). Primary cultures from ADHD model (SHR) showed 76 % of neurons with zero branch points, while WKY showed 57 % ($P = 0.0147$) (Fig. 2B). The percentage of neurons with one and two branch points was lower in SHR neurons when compared to WKY neurons (17 % vs 29.61 % and 2.92 % vs 11.14 %, respectively) (Fig. 2B, Panel A). The number of roots was similar between strains (Fig. 2C). It was observed a trend towards decreasing the total neurite length when compared to WKY neurons (Fig. 2D) and a significant

decrease in the maximal neurite length in ADHD neurons (21 %) ($t = 2.544$; $P < 0.05$) (Fig. 2E, Panel A). tau immunostaining was decreased in ADHD neurons (SHR) (43 %) when compared to WKY neurons ($t = 2.663$; $P = 0.01$) (Fig. 2F, Panel A). The immunoccontent of A₁R and A_{2A}R was similar between neurons from both strains at 5 DIV. At 2 DIV A_{2A}R were less detectable and A₁R immunoccontent was not different between strains (Fig. 2G and H).

3.2. Caffeine and A_{2A}R agonist recover neurite branching and elongation in neurons from ADHD model

In all treatments, the only morphological parameter that remained unaltered was the number of roots (Fig. 1, Supporting information). After 24 h of caffeine incubation (30 μ M), neurons from ADHD model presented lower percentage of zero branch points [$F(1,24) = 9.368$; $P = 0.0054$, interaction], and a higher percentage of neurons with 2 branch points [$F(1,24) = 7.813$; $P = 0.0104$, interaction] (Fig. 3A, Panel M). A trend towards high percentage of neurons with 1 branch point was observed for ADHD neurons after caffeine treatment. Caffeine also promoted an increase in the total [$F(1,24) = 9.150$; $P = 0.0058$; treatment effect] and maximal neurite length in neurons from both strains [$F(1,24) = 10.68$; $P = 0.0033$, treatment effect] (Fig. 3F and K, Panel M).

Since caffeine was able to increase the number of neurons from ADHD model with more branch points, total and maximal neurite length, we further pharmacologically characterized the involvement of A₁R and A_{2A}R receptors. The selective A₁R antagonist (50 nM DPCPX) was devoid of effect [$F(1,16) = 8.431$; $P = 0.0104$, strain effect for zero branch points] and [$F(1,16) = 19.08$; $P = 0.0005$, treatment effect for 2 branch points] (Fig. 3B, Panel P). The total and maximal

neurite length were not affected by A₁R antagonist (Fig. 3 G-L, Panel P). However, A_{2A}R antagonist, neurons from ADHD model also presented a lower percentage of neurons with 0 branch points [F(1,20) = 8.56; P = 0.0084, interaction] and a high percentage of neurons with 1 branch point after treatment with 50 nM SCH 58261 [F(1,20) = 6.805; P = 0.0168, interaction] (Fig. 3C, Panel P). Both total and maximal neurite length were not affected by A₂R antagonist (Fig. 3H-M, Panel P).

We also investigated the effect of A₁R and A_{2A}R activation during the development of frontal cortical neurons of ADHD model and its control strain. It could be noted that in the presence of the selective A₁R agonist (100 nM CPA) only cultures from WKY strain presented a higher percentage of neurons with zero [F(1,14) = 14.67; P = 0.0018, interaction] and 1 branch point [F(1,14) = 13.67; P = 0.0024, interaction] (Fig. 3D), with no effect in ADHD neurons (SHR) as well as total and maximal neurite length in both strains (Fig. 3 I,N, Panel P).

Since activation of A_{2A}R was previously reported to increase dendritic branching (Ribeiro et al., 2016), we also explored if the selective A_{2A}R agonist could alter the neuronal outgrowth of the ADHD model (SHR). The percentage of SHR neurons with zero branch points was lower in the presence of the selective A_{2A}R agonist (50 nM CGS 21680) [F(1,24) = 17.00; P = 0.0004; interaction] (Fig. 3E, Panel P), followed by a high percentage of neurons from 1 up to 5 branch points (two-way ANOVA revealed interaction between strain and treatment for each branch point analyzed) (Fig. 3E, Panel P). The total neurite length [F(1,24) = 8.175; P = 0.0086, interaction] and maximal neurite length [F(1,24) = 5.382; P = 0.0292; interaction] were also increased in neurons from ADHD model incubated with the selective A_{2A}R agonist (Fig. 3J,O, Panel P).

3.3. Caffeine and A_{2A}R agonist via PKA and PI3K signaling re-establish neurites outgrowth from ADHD model

We further used either PKA or PI3K inhibitor in order to identify if one of main transducing systems operated by adenosine receptors, and also in the neuronal differentiation are involved in the effects observed by caffeine and selective blockade of A_{2A}R. The presence of PKA inhibitor KT5720 (5 μM) did not change the ability of caffeine to enhance the percentage of ADHD neurons with more branch points [F(1,12) = 5.336; P = 0.0395; treatment effect] (Fig. 4A, panel M). The effect of caffeine in recovering the total neurite length of neurons from ADHD model was completely blocked by PKA inhibitor [F(1,12) = 31.17; P = 0.0001; inhibitor effect], [F(1,12) = 15.73; P = 0.0019; interaction], [F(1,12) = 18.62; P = 0.0010; treatment effect] (Fig. 4C, panel M). Similar findings were found for maximal neurite length, in which PKA inhibitor completely attenuated the effects of caffeine [F(1,12) = 16.45; P = 0.0016; inhibitor effect], [F(1,12) = 5.32; P = 0.0389; interaction], [F(1,12) = 18.32; P = 0.0010; treatment effect] (Fig. 4E, panel M).

The presence of PKA inhibitor (KT) blunted the effects of CGS 21680 in enhancing the percentage of neurons with 1 branch point from ADHD model [F(1,8) = 6.194; = P 0.03; inhibitor effect] (Fig. 4B, Panel M). PKA inhibitor KT5720 (5 μM) also blocked the effects of CGS on the total neurite length in neurons from ADHD model [F(1,8) = 5.159; P = 0.0528; inhibitor effect] (Fig. 4D, Panel M) and on maximal neurite length [F(1,8) = 10.07; = P 0.0131; inhibitor effect], [F(1,8) = 5.649; P = 0.0448; interaction] (Fig. 4E, Panel M).

We also used LY294002 (50 μ M) as an inhibitor of PI3K (Dijkhuizen and Ghosh, 2005) and its presence blocked the effects of caffeine in increasing the number of branch points in neurons from ADHD model [$F(1,12) = 7.159$; $P = 0.0202$; inhibitor effect] (Fig. 4G, panel M). Besides, the effects of caffeine in preventing decreases in the total neurite length were abolished in the presence of PI3K inhibitor [$F(1,12) = 37.76$; $P < 0.0001$; inhibitor effect], [$F(1,12) = 4.974$; $P = 0.0455$; interaction], [$F(1,12) = 17.17$; $P = 0.0014$; treatment caffeine] (Fig. 4I, Panel M). The same findings were found for the maximal neurite length [$F(1,12) = 18.35$; $P = 0.0011$; inhibitor effect], [$F(1,12) = 6.012$; $P = 0.0305$; interaction], [$F(1,12) = 5.759$; $P = 0.0335$; treatment effect] (Fig. 4J, Panel M). The number of roots was also decreased by PI3K inhibitor in neurons from ADHD model [$F(1,12) = 9.976$; $P = 0.0082$; inhibitor effect] (data not shown).

The PI3K inhibitor LY 294002 (50 μ M) had no evident impact on $A_{2A}R$ agonist in increasing the number of branch points (Fig. 4H, Panel M). The effects of CGS 21680 on total neurite length were blocked in the presence of PI3K inhibitor [$F(1,8) = 10.49$; $P = 0.0119$; inhibitor effect], [$F(1,8) = 12.75$; $P = 0.0073$; treatment effect] (Fig. 4J, Panel M) as well as for the maximal neurite length in neurons from ADHD model [$F(1,8) = 9.505$; $P = 0.0150$; inhibitor effect] (Fig. 4L, Panel M).

3.4. Blockade of $A_{2A}R$ recovers axonal outgrowth via PI3K signaling in neurons from ADHD model

At 5 DIV, neurons from ADHD model presented decreased tau immunoreactivity even after 24 h of incubation with 30 μ M caffeine [$F(1,24) = 7.445$; $P = 0.0117$, strain effect] (Fig. 5A, Panel F), but the selective A_{2A} receptor

antagonist (50 nM SCH 58261) presented a trend towards recovering the axonal growth after 24 h of treatment [$F(1,25) = 3.639$; $P = 0.060$, treatment effect] and [$F(1,25) = 4.689$; $P = 0.0401$; strain effect] (Fig. 5B, Panel F). The selective A_{2A} agonist (50 nM CGS 21680) was also devoid of effect against decreased axonal growth [$F(1,26) = 4.332$; $P = 0.0474$; strain effect] (Fig. 5C, Panel F).

Since the blockade of $A_{2A}R$ presented a trend toward recovering axonal outgrowth in cortical neurons from ADHD model, we decided to evaluate the participation of PI3K and PKA signaling. In another set of experiments, $A_{2A}R$ antagonist was now significantly able to restore axonal outgrowth in ADHD neurons, even in the presence of PKA inhibitor (KT 5720) [$F(1,24) = 9.677$; $P = 0.0048$; treatment effect] (Fig. 4D, Panel G). However, the presence of PI3K inhibitor abolished the effect of $A_{2A}R$ antagonist in promoting axonal outgrowth in ADHD neurons [$F(1,30) = 7.930$; $P = 0.0085$; treatment effect] and [$F(1,30) = 5.321$; $P = 0.0281$; inhibitor effect] (Fig. 4E, Panel G).

4. Discussion

To our best knowledge, it is the first time that morphological alterations were reported during *in vitro* development of frontal cortical neurons from a rat model of ADHD.

It could be noted by MAP-2 and tau analysis that frontal cortical neurons from ADHD model showed less neurite branching, shorter maximal neurite length and decreased axonal outgrowth. Primary neurites were unchanged in frontal cortical neurons from ADHD model; thus they did not present disturbances in more immature stages of neuronal differentiation. MAP-2 is a neurosteroid receptor important for the microtubule polymerization in the outgrowth of neurites,

while tau is a microtubule-associated protein involved in the maintenance of axonal transport that helps to sustain the normal functioning and viability of neurons (Fontaine-Lenoir et al., 2006). In a preliminary study, high tau levels were found in serum from children diagnosed with ADHD, which were considered an indication of disturbances in the microtubules transport (Cetin and Simsek, 2017) and tau null mice displayed hyperactivity (Cantero et al., 2011; Ikegami et al., 2000). These disturbances observed in the neuronal differentiation in ADHD neurons might be translated to neuroimaging findings showing that cortical maturation was slower in ADHD patients (Shaw et al., 2007). In addition, ADHD patients also presented microstructural abnormalities of brain white matter, especially in frontostriatal and corticocortical tracts (Chen et al., 2015; Durston, 2008, Greven et al., 2015; van Ewijk et al., 2012).

In cultured cortical neurons obtained in a strain different from ours, A₁R were located in the cell body region, whereas A_{2A}R in nerve terminals (Rebola et al., 2005), and A_{2A}R were immunodetected as early as at 1 DIV (Ribeiro et al., 2015). It seems that modifications in the density of A₁R and A_{2A}R could not be involved in the morphological alterations observed for ADHD neurons, since the density of both A₁ and A_{2A}R was similar between strains, albeit the latter was almost undetectable at 2 DIV. This is the first report showing both receptors in neurons from SHR, even though adenosine receptors had already been identified in the mesenteric artery sympathetic nerves and adventitial cells of these animals (Rocha-Pereira et al., 2013).

Epidemiological and experimental studies have reported the ability of caffeine in relieving inattention, impulsivity and behavioral outcomes associated to ADHD (Leffa et al., 2019; Nunes et al., 2018; Pires et al., 2009; Prediger et al.,

2005; *for review see Ioannidis et al., 2014*). Caffeine was able to recover neurite branching and elongation from ADHD neurons without effect on primary neurites, suggesting that its effects were towards more mature stages of the neuronal development. The effects of caffeine in ADHD neurons were not mimicked by A₁R antagonist, but A₁R activation promoted less branching in neurons from control strain, which was in line with previous reports (Thevananther et al., 2001).

Based on functional interactions between dopamine and adenosine receptors in the prefrontal cortex, it is plausible to strengthen the notion that caffeine and the manipulation of A_{2A}R could be a potential target in ADHD as well as in other neuropsychiatric disorders (Cunha et al., 2008; Ferré et al., 2018). The activation of A_{2A}R have been described to promote neuritogenesis and differentiation, and also enhancing axonal elongation and dendritic branching in primary cultures of striatal or cortical neurons (Canals et al., 2005; Ribeiro et al., 2015). Here, A_{2A}R agonist had no evident effect on neurons from control strain, but it was more efficient in counteracting alterations related to neurite branching in ADHD neurons than A_{2A}R antagonist, but less than caffeine for rescuing neurite elongation. Besides, different from somatodendritic compartment, only the A_{2A}R antagonist was efficient in recovering axonal outgrowth from ADHD neurons; thus caffeine or selective blockade or activation of A_{2A}R promoted alterations that varied according to the neuronal compartment. It seems that simultaneous blockade of both receptors by caffeine or selective activation of A_{2A}R favors dendritic branching, but not the re-establishment of the axonal outgrowth. Interestingly, human neuroepithelial stem cell-derived neurons incubated with caffeine displayed up-regulation in genes involved in the neuronal development processes, but genes down-regulated for axon extension processes, which are

in line with our findings (Yu et al., 2017). Regarding A_{2A}R, one explanation may rely on the fact that this receptor plays different roles in processes of neuronal differentiation when neurite arborization and axonal elongation were evaluated (Ribeiro et al., 2015). Of note, it needs to be taking into account that the engagement of adenosine receptors during brain development remains elusive (Rodrigues et al., 2018), and this could be even observed for caffeine. In fact, caffeine administered during embryonic period was able to increase NeuN-stained neurons and Sonic Hedgehog (Shh) protein, but brain-derived neurotrophic factor was decreased (Mioranza et al., 2014). In addition, caffeine via A_{2A}R impaired migration and insertion of γ -aminobutyric acid (GABA) neurons into the hippocampal circuitry, when it was administered during a period of synaptogenesis establishment, which lead to seizures episodes in adulthood (Silva et al., 2013).

In order to gain insights into these differences observed for caffeine and A_{2A}R in the somatodendritic and axonal compartment from ADHD neurons, we further investigated the participation of PKA and PI3K pathway. Apart from taking part of the canonical transducing system operated by A_{2A}R, PKA signaling is also involved in the neurite outgrowth (Cabell and Audesirk, 1993; Kao et al., 2002; Koschinski and Zaccolo, 2017; Song and Pool, 1999). The PI3K signaling pathway is essential for axonal stretching (Garrido et al., 2007) since it promotes both neuronal polarity and neurite extension and the blockade of its activity prevented axonal initiation in neurons (Sanchez et al., 2001; Shi et al., 2003, 2004).

Both PKA and PI3K signaling were involved in the elongation of neurites promoted by caffeine in ADHD neurons, while neurite branching was only PI3K

dependent. It is not the first time that both pathways are mediating the effects of caffeine, since PKA activity and downregulation of proteins from the downstream cascade was stimulated by caffeine in Alzheimer's disease mouse model (Zeitlin et al., 2011). In addition, neuroprotective effects of caffeine were blunted in the presence of PI3K inhibitor (Nakaso and Nakashima, 2008). The ability of A_{2A}R agonist in recovering neurite branching and elongation in ADHD neurons was mostly PKA rather than PI3K dependent, so that the canonical signaling pathway of A_{2A}R was predominantly involved in these effects.

Regarding the axonal compartment, the recovery of the outgrowth afforded by A_{2A}R antagonist was clearly dependent on PI3K instead of PKA, whose findings are not at odds with previous observations, which PKA signaling was not involved in the beneficial effects of A_{2A}R antagonist at least in preventing neuronal insults (Canas et al., 2009). Importantly, the participation of PI3K on recovering of axonal outgrowth afforded by A_{2A}R antagonist in ADHD neurons agrees with its crucial role for axonal development (Shi et al., 2003; Menager et al., 2004).

Neurons are one of the most highly polarized cell types and in order to guarantee the flow of information; thus, the formation and maintenance of the axons and dendrites is crucial for proper functionality, development and physiology of the central nervous system (Barnes and Polleux, 2009; Sakakibara and Hatanaka, 2015). Therefore, abnormalities in these processes may lead to dysfunctions reported in neurodevelopmental disorders such as at autism and schizophrenia (Bakhshi and Chance, 2015; Pilz et al., 2002; Wegiel et al., 2010). Although animal models might not completely mimic disorders with high heritability, this rat strain is considered a suitable model for ADHD studies with

some limitations regarding predictive validity (recently reviewed in Leffa et al., 2019; Panzenhagen et al., 2019). Since some evidences have also revealed that SHR presents some traits of schizophrenia (Niigaki et al., 2019), which is another neurodevelopmental disorder, these neuronal morphological alterations reported for the first time would certainly strengthen the potential of this rat model for elucidating processes involved not only in the neurobiology of ADHD, but also in schizophrenia.

New alternatives for ADHD treatment need to be investigated, since approximately 30 % of ADHD patients show little or no symptomatic improvement after receiving stimulant medication, and some side effects caused by methylphenidate are not well tolerated (*for review see Wender, 1998; Wilens et al., 2002*).

Conclusions

In conclusion, we showed the first time that cultured frontal cortical neurons from ADHD model presented clearly pattern of impaired differentiation. Additionally, the present findings have pharmacologically distinguished the beneficial effects of caffeine and uncovered potentially important mechanisms at neuronal level about the role of A_{2A}R in ADHD. By re-establishing neuronal outgrowth in ADHD neurons, caffeine and A_{2A}R strengthen the idea as an adjuvant therapeutic strategy for treatment of this disorder.

Declaration of Interests

All authors declare no financial interests.

Acknowledgements

Funding was supplied by Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and other Brazilian Funding Agencies (CAPES, FAPERGS/PRONEX). Catiane B. Alves, Amanda Staldoni Almeida and Daniela Melo Marques are recipient from CNPq fellowship.

Fig. 1

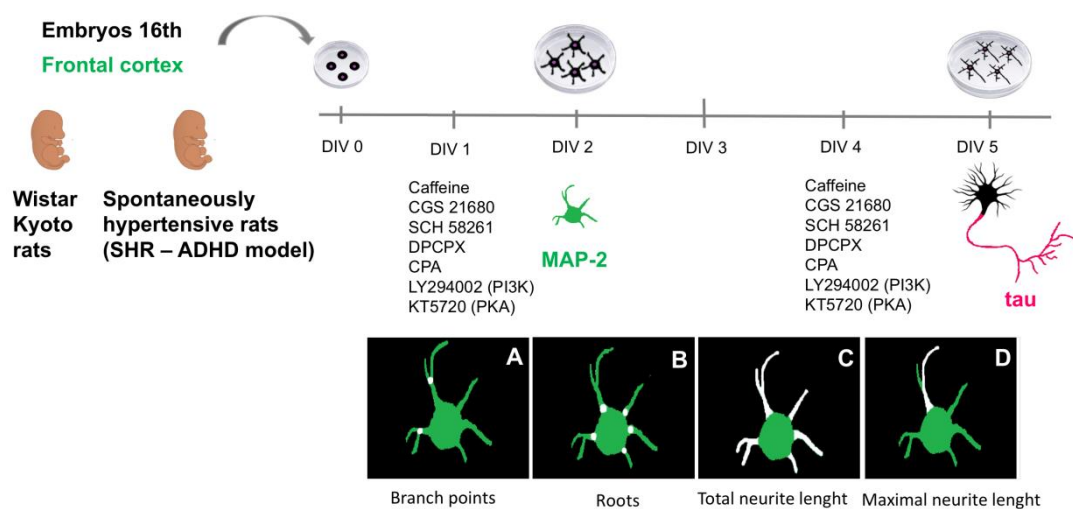


Figure 1 - Schematic overview of the *in vitro* development of frontal cortical neurons from Wistar Kyoto and SHR rats. At 1 or 4 DIV neurons were incubated during 24 h either with caffeine or A₁R or A_{2A}R agonists/antagonists. PKA or PIK3 inhibitors were added 30 minutes prior to caffeine or A_{2A}R agonist/antagonist. At 2 DIV cultured frontal cortical neurons were immunostained for MAP-2 and at 5 DIV for tau protein. Panels show morphometric parameters analyzed during *in vitro* neuronal development. White dots represent (A) - number of branch points; (B) - number of roots; White outlines represent (C) - the total neurite length and (D) - maximal neurite length.

Fig. 2

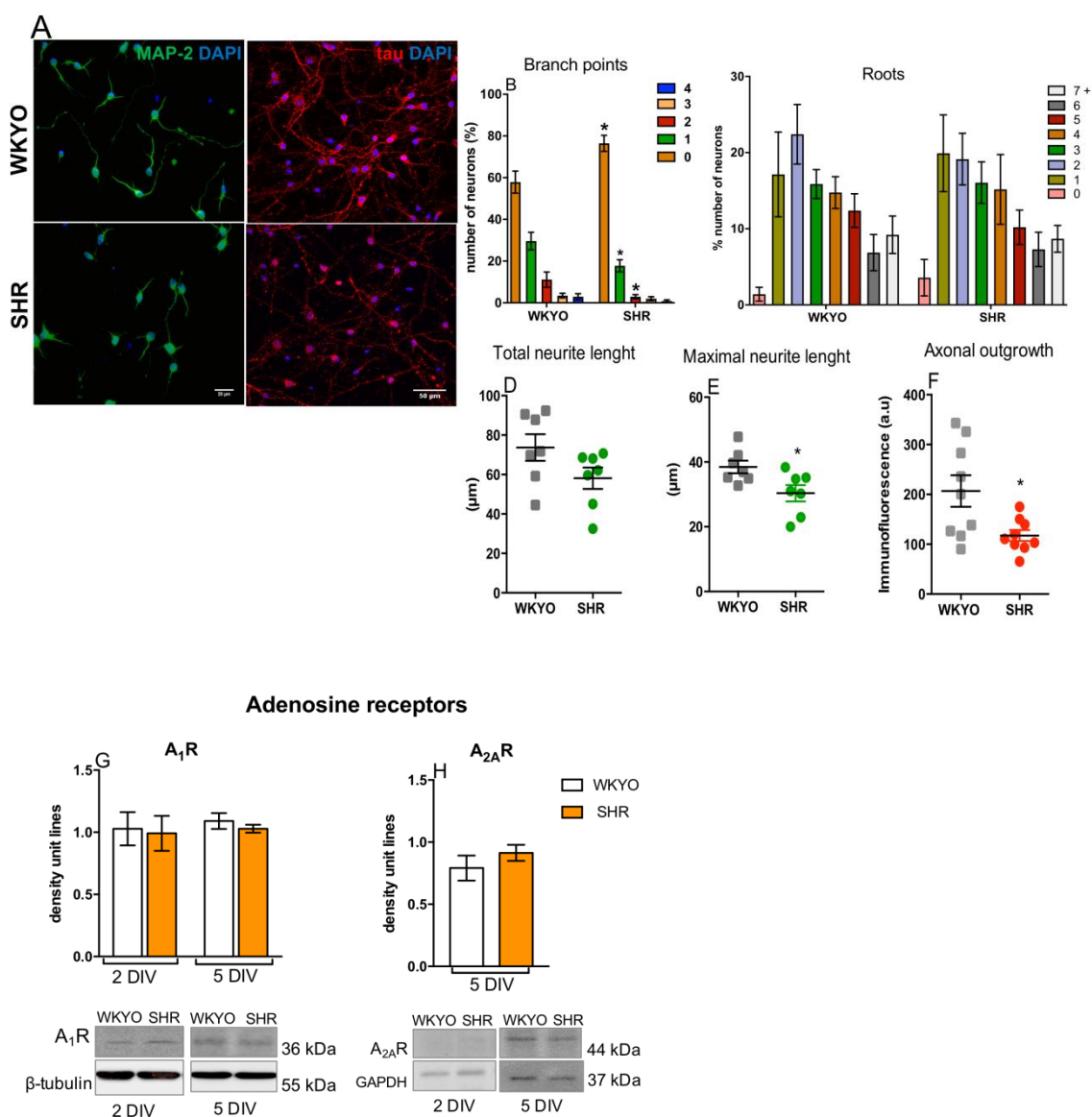
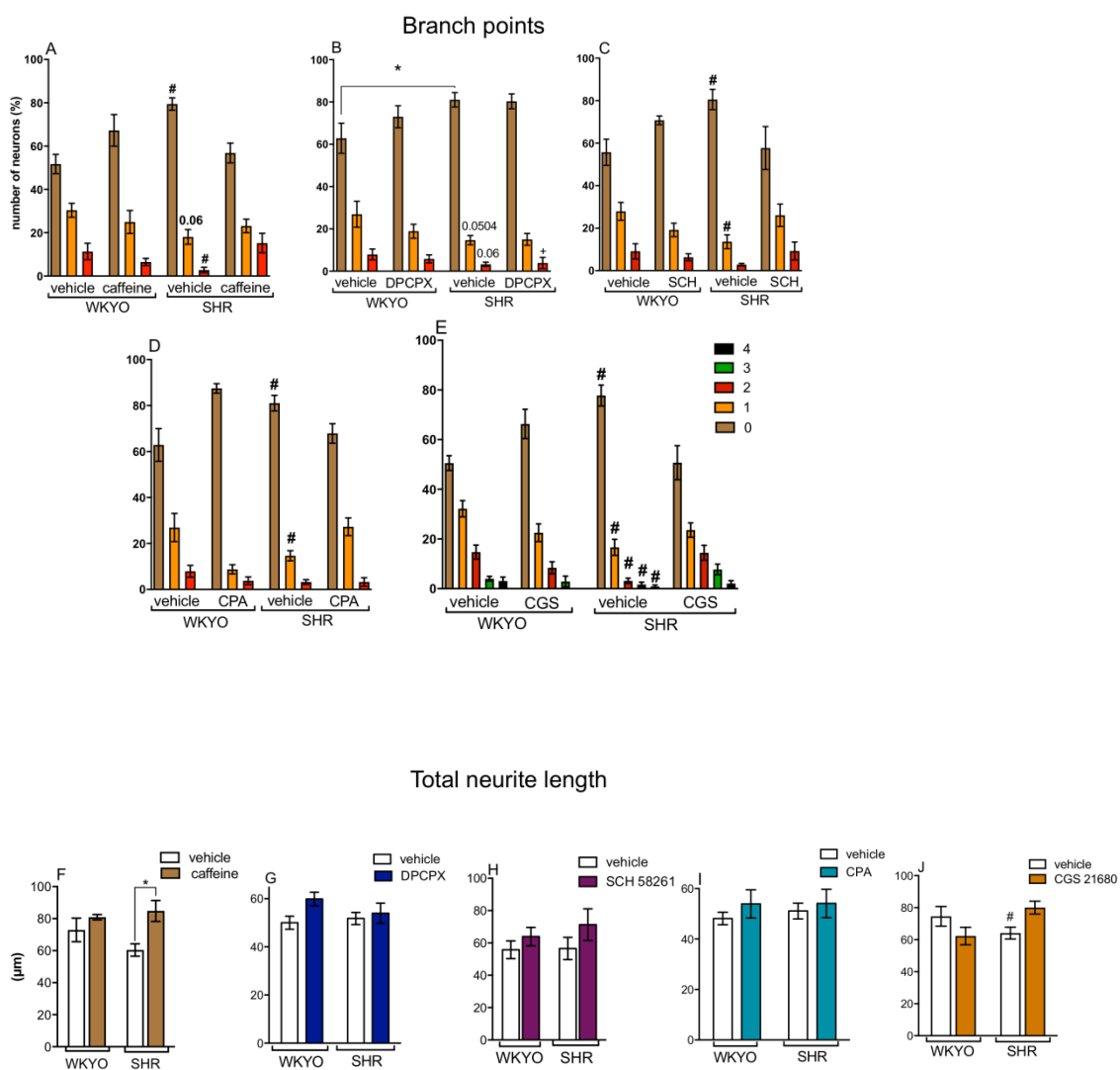


Figure 2 – Morphometric analysis and density of A₁R and A_{2A}R in primary frontal cortical neurons from Wistar-Kyoto rats (WKYO) and ADHD model (SHR). **(A)** - Representative panel of the neuronal morphology from both strains for MAP-2 at 2 DIV (green) and tau at 5 DIV (red) and cell nuclei visualized by DAPI staining (blue). Scale bar (20 or 50 μm), 40 x objective. MAP-2 immunostaining at 2 DIV: **(B)** - branch points and **(C)** - roots amount expressed according to their

occurrence in the percentage of the total neurons analyzed; **(D)** - total neurite length and **(E)** - maximum neurite length (μm). Data are expressed as mean \pm SEM from 7 independent cultures. **(F)** - tau immunofluorescence in arbitrary units (a.u) at 6 DIV. Data are expressed as mean \pm SEM from 9 independent cultures. * $P < 0.05$; compared to WKY. Unpaired Student's *t* test; Immunocontent of $A_{2A}R$ and A_{1R} at 2 and 5 DIV. **(G)** - A_1 receptors **(H)** - A_{2A} receptors only detectable at 5 DIV. Data are represented as means- \pm S.E.M of unit density lines (normalized for GAPDH or β -tubulin) from 6-7 independent cultures for each strain. At the bottom of the figures are representative bands of the immunodetected proteins.

Fig. 3



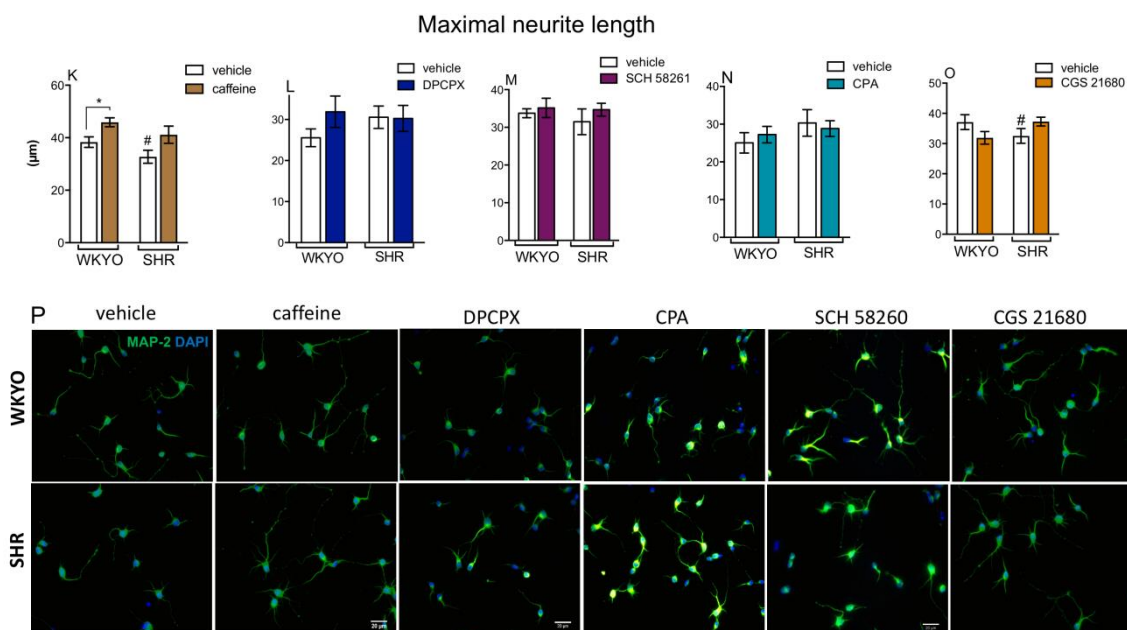
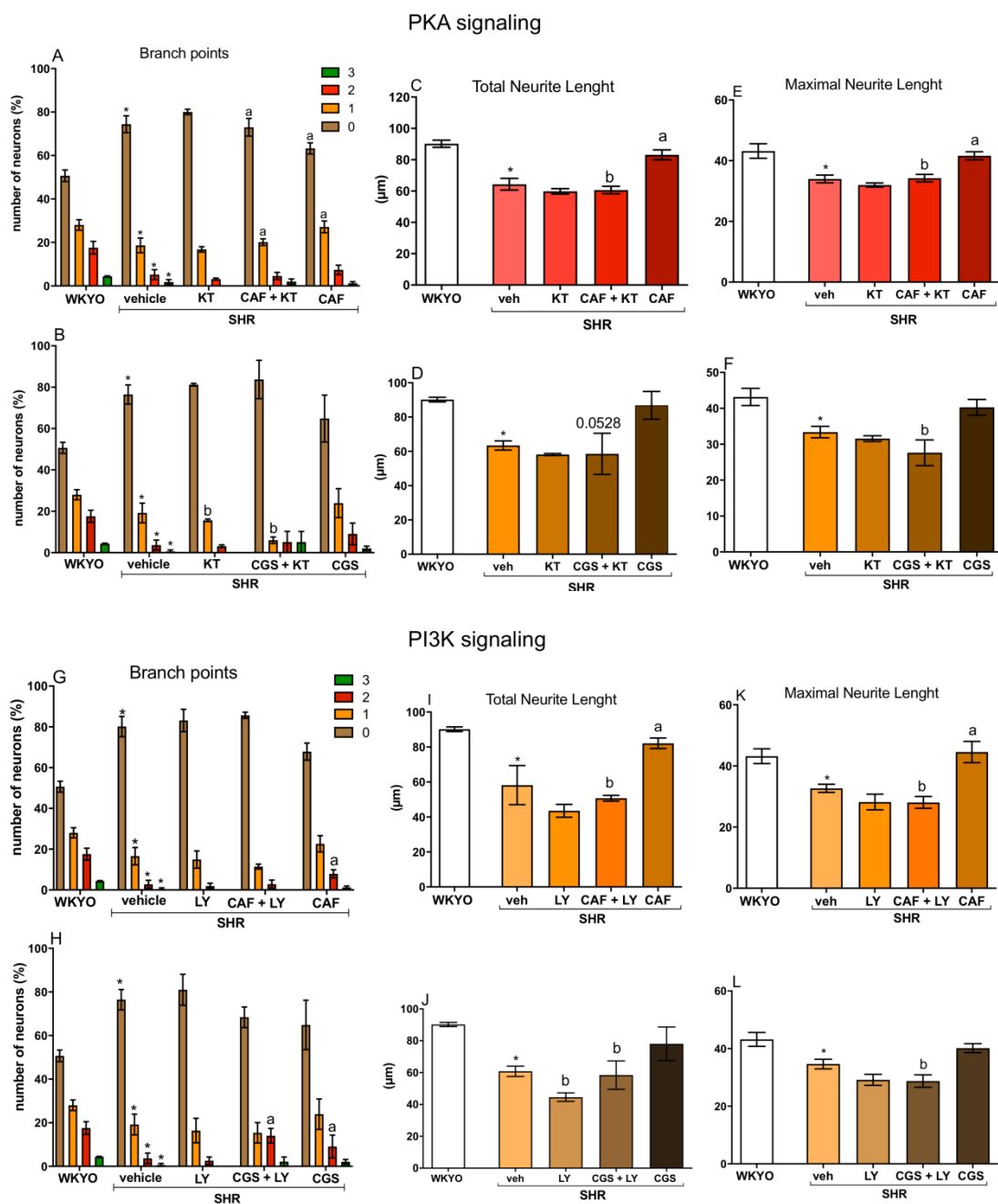


Figure 3 - Somatodendritic analysis of the impact of caffeine and A_1R and A_2AR agonists/antagonists treatment during *in vitro* development of frontal cortical neurons from Wistar-Kyoto rats (WKY) and ADHD model (SHR). At 1 DIV neurons were incubated with either 30 μM caffeine, or A_1R agonists/antagonists (100 nM CPA, 50 nM DPCPX, respectively) or A_2AR agonists/antagonists (50 nM CGS 21680, SCH 58261, respectively) during 24 h and then immunostained for MAP-2. (A-E) - branch points amount expressed according to their occurrence in the percentage of the total neurons analyzed; (F-J) - total and (K-O) - maximum neurite length (μm). Data are expressed as mean \pm SEM from 7 independent cultures for caffeine experiments. For A_1R agonist/antagonist experiments 5-6 independent cultures were used. For A_2AR agonist/antagonist experiments 5-7 independent cultures were used. #P < 0.01, interaction between strain and treatment (different from WKY vehicle and SHR neurons treated with their respective treatments); *P < 0.01, differences between groups; +P < 0.05, different from SHR vehicle; P = 0.06; 0.05; compared to WKY, strain effect; Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. (P) - Representative panel of

WKY and ADHD model (SHR) at 2 DIV immunostained with MAP-2 (green) and cell nuclei visualized by DAPI staining (blue). Scale bar (20 μm), 40 x objective.

Fig. 4



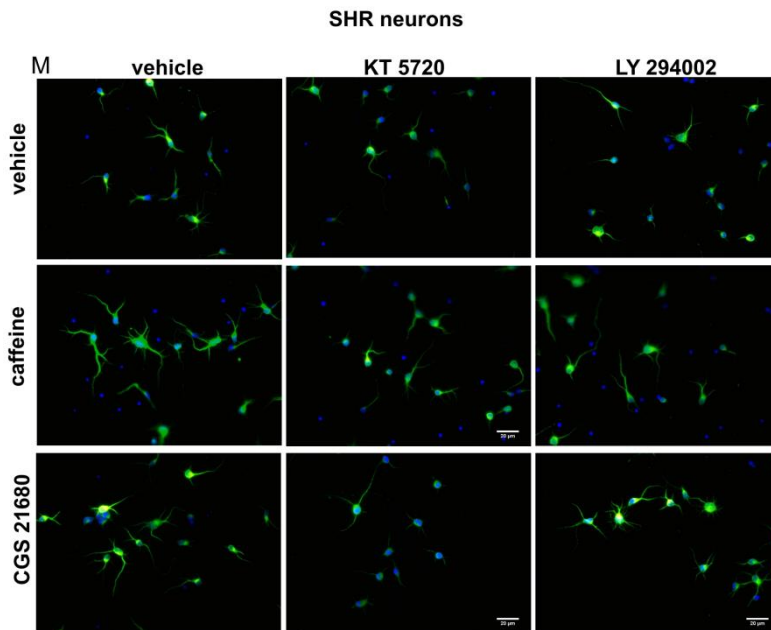
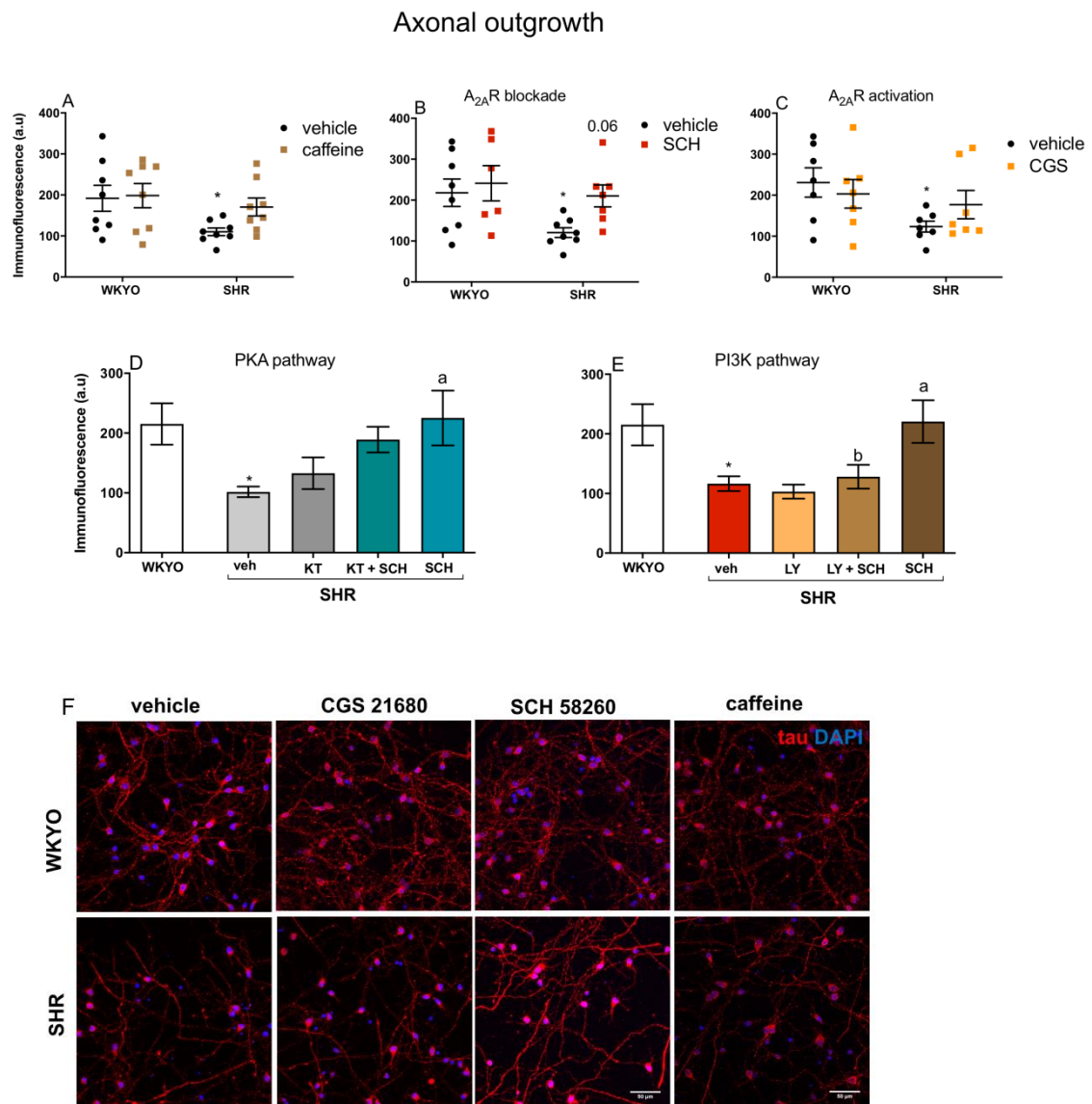


Figure. 4 – PKA and PI3K signaling mediating the effects of caffeine and $A_{2A}R$ agonist (CGS 21680) during *in vitro* development of frontal cortical neurons from ADHD model (SHR). Morphometric parameters were analyzed following 24 hours after exposure to either 30 μM caffeine (CAF) or 50 nM CGS 21680, in the presence of either PKA (0.5 μM KT 5720) or PI3K inhibitor (50 μM LY 294002) or vehicle, each one added 30 min before caffeine or CGS 21680. (**A, B, G, H**) - branch points amount expressed according to their occurrence in the percentage of the total neurons analyzed; (**C, D, I, J**) – total and (**E, F, K, L**) – maximal neurite length (μm). Data are expressed as mean \pm SEM from 4 independent cultures for caffeine experiments and 3 independent cultures for CGS 21680. * $P < 0.05$; compared to WKY group, Unpaired Student's t test; ^a $P < 0.05$, treatment effect; ^b $P < 0.05$, inhibitor effect; $P = 0.0528$, inhibitor effect. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test; (**M**) – Panels showing differences in the neuronal morphology of frontal cortical cultures were verified at 2 DIV by MAP2 immunostaining 2 (green). Cell nuclei were visualized by DAPI staining (blue). Scale bar (20 μm), 40 x objective.

Fig. 5



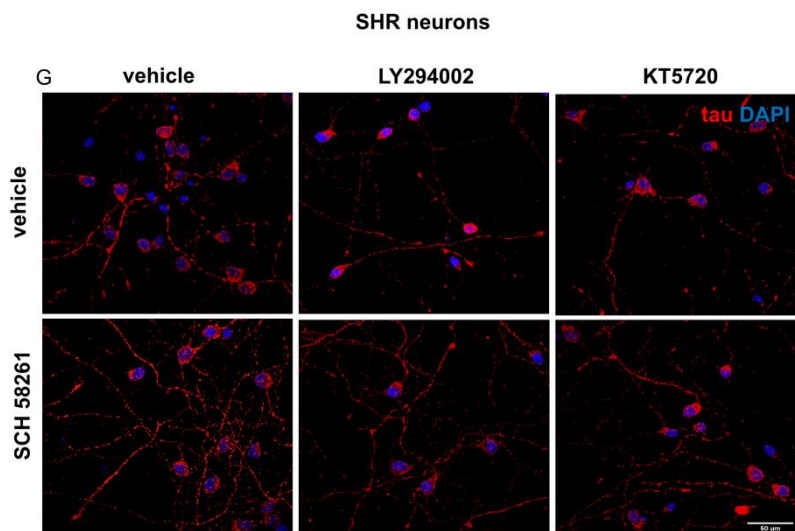


Figure. 5 – PKA and PI3K mediating effects of adenosine $A_{2A}R$ antagonist (SCH 58261). during in vitro axonal outgrowth frontal cortical neurons from WKY and ADHD model (SHR). tau immunofluorescence of neurons at 5 DIV after 24 hours of treatment with (A) – vehicle or caffeine (30 μ M); (B) - vehicle or 50 nM CGS 21680 and (C) - vehicle or 50 nM SCH 58261 (selective $A_{2A}R$ antagonist). Data are expressed as mean \pm SEM of immunofluorescence arbitrary units (a.u) from 6-8 independent cultures for caffeine experiments. For $A_{2A}R$ agonist/antagonist, 7-8 independent cultures were used. * $P < 0.05$; different from WKY groups; strain effect; $P = 0.06$, treatment effect; tau immunoreactivity was also analyzed 24 hours after exposure to SCH 58261 (50 nM), in the presence of either (D) - PKA inhibitor (0.5 μ M KT 5720) or (E) - PI3K inhibitor (50 μ M LY 294002) or vehicle. Data are expressed as mean \pm SEM of fluorescence arbitrary units (a.u) from 7-8 independent cultures. * $P < 0.05$; compared to WKY; ^a $P < 0.05$, treatment effect; ^b $P < 0.05$, inhibitor effect; Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test; (F, G) – Representative panel of differences in the axonal outgrowth according to

treatments and strains at 6 DIV by tau immunostaining (red). Cell nuclei were visualized by DAPI staining (blue). Scale bar (20 μm), 40 x objective.

References

- Andrew, F. R., Luiz, P., Robert, D., Leslie, G. U., 2009. The prefrontal cortex and the executive control of attention. *Exp. Brain. Res.* 192, 489–497. <https://doi.org/10.1007/s00221-008-1642-z>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00225-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00225-3)
- Ardais, A.P., Borges, M.F., Rocha, A.S., Sallaberry, C., Cunha, R.A., Porciúncula, L.O., 2014. Caffeine triggers behavioral and neurochemical alterations in adolescent rats. *Neuroscience* 270, 27-39. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.003.
- Bakhshi, K., Chance, A., 2015. Neuropathology of Schizophrenia: a selective review of past studies and emerging themes in brain structure and cytoarchitecture. *Neuroscience.* 303, 82–102. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.028>
- Barnes, A. P., Polleux, F., 2009. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 347-381. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125536>
- Biederman, J., Faraone, S. V., 2005. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet.* 366, 237–248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66915-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66915-2)
- Borota, D., Murray, E., Keceli, G., Chang, A., Watabe, J.M., Ly, M., Toscano, J.P., Yassa, M.A., 2014. Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. *Nat Neurosci.* 17, :201-3. doi: 10.1038/nn.3623.

Caballero, M., Núñez, F., Ahern, S., Cuffí, M.L., Carbonell, L., Sánchez, S., Fernández-Dueñas, V., Ciruela, F., 2011. Caffeine improves attention deficit in neonatal 6-OHDA lesioned rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neurosci Lett.* 494, 44-8. doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.050.

Cabell, L., Audesirk, G., 1993. Effects of selective inhibition of protein kinase C, cyclic AMP-dependent protein kinase, and Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase on neurite development in cultured rat hippocampal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 11, 357–368. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(93\)90007-Z](https://doi.org/10.1016/0736-5748(93)90007-Z)

Canals, M., Angulo, E., Casadó, V., Canela, E.I., Mallol, J., Viñals, F., Staines, W., Tinner, B., Hillion, J., Agnati, L., Fuxe, K., Ferré, S., Lluís, C., Franco, R., 2005. Molecular mechanisms involved in the adenosine A1 and A2A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. *J. Neurochem.* 92, 337-48.

Canas, P.M., Porciúncula, L.O., Cunha, G.M., Silva, C.G., Machado, N.J., Oliveira, J.M., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., 2009. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* 29, 14741–14751. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3728-09.2009>

Cantero, J. L., Moreno-lopez, B., Portillo, F., Rubio, A., Avila, J., Hita-yon, E., 2011. Role of tau Protein on Neocortical and Hippocampal Oscillatory Patterns. *Hippocampus.* 834, 827–834. <https://doi.org/10.1002/hipo.20798>

Castellanos, F. X., Sonuga-Barke, E. J. S., Milham, M. P., Tannock, R., 2006. Characterizing cognition in ADHD: beyond executive dysfunction. *Trends. Cogn. Sci.* 10, 117-23. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2006.01.011>

Castellanos, F.X., Lee, P.P., Sharp, W., Jeffries, N.O., Greenstein, D.K., Clasen, L.S., Blumenthal, J.D., James, R.S., Ebens, C.L., Walter, J.M., Zijdenbos, A., Evans, A.C., Giedd, J.N., Rapoport, J.L., 2002. Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA* 288, 1740-1748. <https://doi.org/10.1001/jama.288.14.1740>

Cetin, I., Simsek, S., 2017. A Preliminary Study on Investigation of Serum α -Synuclein and tau Protein Levels in Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Indian J. Clin. Biochem.* 32, 285–291. <https://doi.org/10.1007/s12291-016-0602-9>

Chen, L., Huang, X., Lei, D., He, N., Hu, X., Chen, Y., Li, Y., Zhou, J., Guo, L., Kemp, G.J., Gong, Q.Y., 2015. Microstructural abnormalities of the brain white matter in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Psychiatry. Neurosci.* 40, 280-287. <https://doi.org/10.1503/jpn.140199>.

Conde, C., Cáceres, A., 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 319–332. <https://doi.org/10.1038/nrn2631>

Cortese, S., 2012. The neurobiology and genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): What every clinician should know. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 16, 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2012.01.009>

Costa, M.S., Botton, P.H., Mioranza, S., Ardais, A.P., Moreira, J.D., Souza, D.O., Porciúncula, L.O., 2008a. Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunoccontent in the hippocampus. *Neurochem Int.* 53, 89-94. doi: 10.1016/j.neuint.2008.06.006.

Costa, M.S., Botton, P.H., Mioranza, S., Souza, D.O., Porciúncula, L.O., 2008b. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tirosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience.* 153, 1071-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.038.

Cunha, R.A., Ferré, S., Vaugeois, J.M., Chen, J.F., 2008. Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. *Curr Pharm Des.* 14, 1512-24.

Del-Ponte, B., Santos, I.S., Tovo-Rodrigues, L., Anselmi, L., Munhoz, T.N., Matijasevich, A., 2016. Caffeine consumption during pregnancy and ADHD at the age of 11 years: a birth cohort study. *BMJ Open.* 6, e012749. doi: 10.1136/bmjopen-2016-012749.

Dijkhuizen, P, A., Ghosh, A, 2005. BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways. *J. Neurobiol.* 62, 278–288. <https://doi.org/10.1002/neu.20100>

Duan, K., Chen, J., Calhoun, V. D., Lin, D., Jiang, W., Franke, B., Buitelaar, J. K., Hoogmand, M., Arias-Vasquez, A., Turner, J.A., Liu, J., 2018. Neural correlates of cognitive function and symptoms in attention-deficit/hyperactivity disorder in adults. *Neuroimage. Clin.* 19, 374–383. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2018.04.035>

Durston, S., 2008. Converging methods in studying attention-deficit/hyperactivity disorder: what can we learn from neuroimaging and genetics? *Dev. Psychopathol.* 20, 1133–1143. <https://doi.org/10.1017/S0954579408000539>

Ernst, M., Bolla, K., Mouratidis, M., Contoreggi, C., Matochik, J.A., Kurian, V., Cadet, J.L., Kimes, A.S., London, E.D., 2002. Decision-making in a Risk-taking Task: A PET Study. *Neuropsychopharmacology.* 26, 685–691. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00414-6](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00414-6)

Espinosa, J., Rocha, A., Nunes, F., Costa, M.S., Schein, V., Kazlauckas, V., Kalinine, E., Souza, D.O., Cunha, R.A., Porciúncula, L.O., 2013. Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. *J Alzheimers Dis.* 34, 509-18. doi: 10.3233/JAD-111982.

Ferré, S., Díaz-Ríos, M., Salamone, J.D., Prediger, R.D., 2018. New Developments on the Adenosine Mechanisms of the Central Effects of Caffeine and Their Implications for Neuropsychiatric Disorders. *J Caffeine Adenosine Res.* 8, 121-131. doi: 10.1089/caff.2018.0017.

Firestone, P., Davey, J., Goodman, J.T., Peters, S., 1978. The effects of caffeine and methylphenidate on hyperactive children. *J. Am. Acad. Child Psychiatry.* 17, 445-56

Fontaine-Lenoir, V., Chambraud, B., Fellous, A., David, S., Duchossoy, Y., Baulieu, E.E., Robel, P., 2006. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 4711-4716. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600113103>

Fraporti, T.T., Contini, V., Tovo-Rodrigues, L., Recamonde-Mendoza, M., Rovaris, D.L., Rohde, L.A., Hutz, M.H., Salatino-Oliveira, A., Genro, J.P., 2019.

Synergistic effects between ADORA2A and DRD2 genes on anxiety disorders in children with ADHD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 93, 214-220. doi: 10.1016/j.pnpbp.2019.03.021.

Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., Zvartau, E. E., 1999. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacol. Rev.* 51, 83–133. [https://doi.org/0031-6997/99/5101-0083\\$03.00/0](https://doi.org/0031-6997/99/5101-0083$03.00/0)

Garfinkel, B.D., Webster, C.D., Sloman, L., 1981. Responses to methylphenidate and varied doses of caffeine in children with attention deficit disorder. *Can J Psychiatry*. 26, 395-401. <https://doi.org/10.1177/070674378102600602>

Garrido, J., Simon, D., Varea, O., Wandosell, F., 2007. GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS. Leters.* 581, 1579–1586. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.018>

Greven, C.U., Bralten, J., Mennes, M, O'Dwyer, L, van Hulzen, K.J., Rommelse, N., Schweren, L.J., Hoekstra, P.J., Hartman, C.A., Heslenfeld, D., Oosterlaan, J., Faraone, S.V., Franke, B., Zwiers, M.P., Arias-Vasquez, A., Buitelaar, J.K., 2015. Developmentally Stable Whole-Brain Volume Reductions and Developmentally Sensitive Caudate and Putamen Volume Alterations in Those With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Their Unaffected Siblings. *JAMA. Psychiatry*. 72, 490–499. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.3162>

Harvey, D.H., Marsh, R.W., 1978. The effects of de-caffeinated coffee versus whole coffee on hyperactive children. *Dev Med Child Neurol*. 20, 81-86. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1978.tb15183.x>

Hoogman, M., Bralten, J., Hibar, D.P., Mennes, M., Zwiers, M.P., et al., 2017. Subcortical brain volume differences in participants with attention deficit

hyperactivity disorder in children and adults: a cross-sectional mega-analysis. *Lancet Psychiatry*. 4, 310-319. doi: 10.1016/S2215-0366(17)30049-4.

Ikegami, S., Harada, A., Hirokawa, N., 2000. Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 279, 129–132. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00964-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00964-7)

Ioannidis, K., Chamberlain, S.R., Müller, U., 2014. Ostracising caffeine from the pharmacological arsenal for attention-deficit hyperactivity disorder- was this a correct decision? A literature review. *J. Psychopharmacol.* 28, 30-36. <https://doi.org/10.1177/0269881114541014>

Kao, H., Song, H., Porton, B., Ming, G., Hoh, J., Abraham, M., Czernik, A.J., Pieribone, V.A., Poo, M.M., Greengard, P., 2002. A protein kinase A – dependent molecular switch in synapsins regulates neurite outgrowth. *Nat. Neurosci.* 5, 431–437. <https://doi.org/10.1038/nn840>

Kaufmann, W.E., Taylor, C.V., Hohmann, C.F., Sanwal, I.B., Naidu, S., 1997. Abnormalities in neuronal maturation in Rett syndrome neocortex: preliminary molecular correlates. *Eur. Child. Adolesc. Psychiatry.* 6, 75-77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9452926>

Koschinski, A., Zaccolo, M. 2017. Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: implications for compartmentalization of cAMP signalling. *Sci. Rep.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13021-y>

Laurent, C., Eddarkaoui, S., Derisbourg, M., Leboucher, A., Demeyer, D., Carrier, S., Schneider, M., Hamdane, M., Müller, C.E., Buée, L., Blum, D., 2014. Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau

pathology. *Neurobiol Aging*. 35, 2079-90. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.027.

Leffa, D.T., Ferreira, S.G., Machado, N.J., Souza, C.M., Rosa, F.D., de Carvalho, C., Kincheski, G.C., Takahashi, R.N., Porciúncula, L.O., Souza, D.O., Cunha, R.A., Pandolfo, P., 2019. Caffeine and cannabinoid receptors modulate impulsive behavior in an animal model of attentional deficit and hyperactivity disorder. *Eur. J. Neurosci*. 49, 1673-1683 [https://doi.org/doi: 10.1111/ejn.14348](https://doi.org/doi:10.1111/ejn.14348)

Leffa, D.T., Panzenhagen, A.C., Salvi, A.A., Bau, C.H.D., Pires, G.N., Torres, I.L.S., Rohde, L.A., Rovaris, D.L., Grevet, E.H., 2019. Systematic review and meta-analysis of the behavioral effects of methylphenidate in the spontaneously hypertensive rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 100, 166-179. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.02.019..

Leon, M.R., 2000. Effects of caffeine on cognitive, psychomotor, and affective performance of children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Atten Disord* 4, 27–47.

Martinussen, R., Hayden, J., Hogg-johnson, S., Tannock, R., 2005. A Meta-Analysis of Working Memory Impairments in Children With Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*. 44, 377–384. <https://doi.org/10.1097/01.chi.0000153228.72591.73>

Menager, C., Arimura, N., Fukata, Y., Kaibuchi, K., 2004. PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J. Neurochem*. 89, 109–118. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2004.02302.x>

Mioranza, S., Nunes, F., Marques, D.M., Fioreze, G.T., Rocha, A.S., Botton, P.H., Costa, M.S., Porciúncula, L.O., 2014. Prenatal caffeine intake differently

affects synaptic proteins during fetal brain development. *Int J Dev Neurosci.* 36, 45-52. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.04.006.

Molero, Y., Gumpert, C., Serlachius, E., Lichtenstein, P., Walum, H., Johansson, D., Anckarsäter, H., Westberg, L., Eriksson, E., Halldner, L.A., 2013. A study of the possible association between adenosine A2A receptor gene polymorphisms and attention-deficit hyperactivity disorder traits. *Genes Brain Behav.* 12, 305-10. doi: 10.1111/gbb.12015.

Mukaetova-Ladinska, E.B., Arnold, H., Jaros, E., Perry, R., Perry, E., 2004. Depletion of MAP2 expression and laminar cytoarchitectonic changes in dorsolateral prefrontal cortex in adult autistic individuals. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 30, 615-623. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00574.x>

Nakaso, K., Ito, S., Nakashima, K., 2008. Caffeine activates the PI3K / Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson ' s disease model of SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 432, 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.12.034>

Niigaki, S.T., Peres, F.F., Ferreira, L., Libanio, T., Gouvea, D.A., Levin, R., Almeida, V., Silva, N.D., Diana, M.C., Suiama, M.A., Calzavara, M.B., Abilio, V.C. 2019. Young spontaneously hypertensive rats (SHRs) display prodromal schizophrenia-like behavioral abnormalities. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 90, 169-176. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.11.020.

Nunes, F., Pochmann, D., Almeida, A.S., Marques, D.M., Porciúncula, L.O., 2018. Differential Behavioral and Biochemical Responses to Caffeine in Male and Female Rats from a Validated Model of Attention Deficit and Hyperactivity

Disorder. *Mol. Neurobiol.* 55, 8486-8498. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1000-5>.

Pandolfo, P., Machado, N.J., Köfalvi, A., Takahashi, R.N., Cunha, R.A., 2013. Caffeine regulates frontocostriatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Neuropsychopharmacol.* 23, 317-28. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.04.011.

Panzenhagen, A.C., Bau, C.H.D., Grevet, E.H., Rovaris, D.L., 2019. An animal model of what? The case of spontaneously hypertensive rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 94, 109617. doi: 10.1016/j.pnpbp.2019.03.012.

Peres, F.F., Eufrásio, R.Á., Gouvêa, D.A., Diana, M.C., Santos, C.M., Swardfager, W., Abílio, V.C., Cogo-Moreira, H., 2018. A schizophrenia-like behavioral trait in the SHR model: Applying confirmatory factor analysis as a new statistical tool. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 85, 16-22. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.03.021.

Pilz, D., Stoodley, N., Golden, J.A., 2002. Neuronal Migration, Cerebral Cortical Development, and Cerebral Cortical Anomalies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 1–11. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.1.1>

Pires, V.A., Pamplona, F.A., Pandolfo, P., Fernandes, D., Prediger, R.D., Takahashi, R.N., 2009. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: A rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav. Pharmacol.* 20, 134–145. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32832a80bf>.

Polanczyk, G.V., Salum, G.A., Sugaya, L.S., Caye, A., Rohde, L.A., 2015. Annual research review: a meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. *J. Child Psychol. Psychiatry* 56, 345–65. doi: 10.1111/jcpp.12381.

Prediger, R.D., Pamplona, F.A., Fernandes, D., Takahashi, R.N., 2005a. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) - The spontaneously hypertensive rat (SHR). *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 8, 583–594. <https://doi.org/10.1017/S1461145705005341>

Prediger, R. D. S., Fernandes, D., Takahashi, R. N., 2005b. Blockade of adenosine A_{2A} receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav. Brain Res.* 159, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.10.017>

Rebola, N., Rodrigues, R.J., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., 2005. Different roles of adenosine A₁, A_{2A} and A₃ receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons. *Neurochem. Int.* 47, 317-325. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.05.009>

Ribeiro, F. F., Neves-Tomé, R., Assaife-Lopes, N., Santos, T. E., Silva, R. F. M., Brites, D., Ribeiro, J.A., Sousa, M.M., Sebastião, A. M., 2016. Axonal elongation and dendritic branching is enhanced by adenosine A_{2A} receptors activation in cerebral cortical neurons. *Brain Struct. Funct.* 221, 2777- 2799. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1072-1>

Rocha-Pereira, C., Arribas, S.M., Fresco, P., González, M.C., Gonçalves, J., Diniz, C., 2013. Impaired inhibitory function of presynaptic A₁-adenosine

receptors in SHR mesenteric arteries. *J. Pharmacol. Sci.* 122, 59-70.

<https://doi.org/10.1254/jphs.12266FP>

Rodrigues, R.J., Marques, J.M., Cunha, R.A., 2018. Purinergic signalling and

brain development. *Semin. Cell. Dev. Biol.* pii: S1084-9521(18)30065-X.

<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.12.001>.

Russell, V. A., 2011. Overview of Animal Models of Attention Deficit Hyperactivity

Disorder (ADHD). *Curr. Protoc. Neurosci.* 9, 1–9.

<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0935s54>

Sakakibara, A., Hatanaka, Y., 2015. Neuronal polarization in the developing

cerebral cortex. *Front. Neurosci.* 9, 1–10.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00116>

Sallaberry, C., Nunes, F., Costa, M.S., Fioreze, G.T., Ardais, A.P., Botton, P.H.,

Klaudat, B., Forte, T., Souza, D.O., Elisabetsky, E., Porciúncula, L.O., 2013.

Chronic caffeine prevents changes in inhibitory avoidance memory and

hippocampal BDNF immunocontent in middle-aged rats. *Neuropharmacology.*

2013 64, 153-9. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.010.

Sanchez, S., Sayas, C. L., Lim, F., Avila, J., Wandosell, F., 2001. The inhibition

of phosphatidylinositol-3-kinase induces neurite retraction and activates GSK3.

J. Neurochem. 78, 468–481. <https://doi.org/0.1046/j.1471-4159.2001.00453.x>

Shaw, P., Eckstrand, K., Sharp, W., Blumenthal, J., Lerch, J. P., Greenstein, D.,

Clasen L., Evans, A., Giedd, J., Rapoport, J. L., 2007. Attention-

deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation.

Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 19649–19654.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0707741104>

- Shaw, P., Malek, M., Watson, B., Sharp, W., Evans, A., Greenstein, D., 2012. Development of cortical surface area and gyrification in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry.* 72, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.01.031>
- Shelton, M.A., Newman, J.T., Gu, H., Sampson, A.R., Fish, K.N., MacDonald, M.L., Moyer, C.E., DiBitetto, J.V., Dorph-Petersen, K.A., Penzes, P., Lewis, D.A., Sweet, R.A., 2015. Loss of Microtubule-Associated Protein 2 Immunoreactivity Linked to Dendritic Spine Loss in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 78, 374-385. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.12.029>
- Shi, S., Cheng, T., Jan, L. Y., Jan, Y., 2004. APC and GSK-3 Are Involved in mPar3 Targeting to the Nascent Axon and Establishment of Neuronal Polarity. *Curr. Biol.* 14, 2025–2032. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.11.009>
- Shi, S., Jan, L. Y., Jan, Y., Francisco, S., 2003. Hippocampal Neuronal Polarity Specified by Spatially Localized mPar3 / mPar6 and PI3-Kinase Activity. *Cell.* 112, 63–75. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01249-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01249-7)
- Silva, C.G., Métin, C., Fazeli, W., Machado, N.J., Darmopil, S., Launay, P.S., Ghestem, A., Nesa, M.P., Bassot, E., Szabó, E., Baqi, Y., Müller, C.E., Tomé, A.R., Ivanov, A., Isbrandt, D., Zilberter, Y., Cunha, R.A., Esclapez, M., Bernard, C., 2013. Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice. *Sci Transl Med.* 5, 197ra104. doi: 10.1126/scitranslmed.3006258.
- Song, H., Pool, M., 1999. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 355–363.
- Thevananther, S., Rivera, A., Rivkees, S.A., 2001. A1 adenosine receptor activation inhibits neurite process formation by Rho kinase-mediated pathways.

Neuroreport. 12, 3057-3063. <https://doi.org/10.1097/00001756-200110080-00015>

van Ewijk, H., Heslenfeld, D.J., Zwiers, M.P., Buitelaar, J.K., Oosterlaan, J., 2012. Diffusion tensor imaging in attention deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1093–1106. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.01.003>.

Yu, N.Y., Bieder, A., Raman, A., Mileti, E., Katayama, S., Einarsdottir, E., Fredholm, B.B., Falk, A., Tapia-Páez, I., Daub, C.O., Kere, J., 2017. Acute doses of caffeine shift nervous system cell expression profiles toward promotion of neuronal projection growth. *Sci Rep.* 7, 11458. doi: 10.1038/s41598-017-11574-6.

Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Imaki, H., Wegiel, J., Marchi, E., 2010. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta. Neuropathol.* 119, 755–770. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0655-4>

Wender, P.H., 1998. Pharmacotherapy of attention-deficit/hyperactivity disorder in adults. *J. Clin. Psychiatry.* 59 Suppl 7, 76-79.

Wilens, T.E., Biederman, J., Spencer, T.J., 2002. Attention deficit/hyperactivity disorder across the lifespan. *Annu Rev Med.* 53, 113-31.

Zeitlin, R., Patel, S., Burgess, S., Arendash, G.W., Echeverria, V., 2001. Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice. *Brain. Res.* 1417, 127-136. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.08.036>.

PARTE III

3 DISCUSSÃO

3.1 Comportamento relacionado à ansiedade e os efeitos da cafeína em ratos infantis do modelo do TDAH.

Nesta tese, com uma abordagem comportamental procuramos traçar as diferenças sexuais no perfil de comportamentos relacionados à ansiedade no modelo animal do TDAH, comparados com a cepa de controle (WKY). Paralelamente, também foram investigadas as possíveis alterações frente ao tratamento com cafeína, pois há escassez de estudos explorando os seus efeitos no comportamento relacionado à ansiedade no modelo do TDAH. As ninhadas recebiam a cafeína na água de beber (0,3 g / L) pela ingestão através das mães, a partir do 8º dia pós-natal (DPN) até o 23º DPN. Avaliamos o perfil de comportamentos do tipo ansioso numa bateria de testes, realizados do 21º ao 23º DPN, um teste por dia, conforme sequência: i) teste do campo aberto (CA); ii) labirinto em cruz elevado (LCE) e iii) teste da caixa clara-escuro (TCE).

As diferenças entre as linhagens na exposição a arena de campo aberto revelaram que os animais SHR de ambos os sexos, evitam a área central, sugerindo um comportamento relacionado à ansiedade. O aumento observado da locomoção na área periférica da arena condiz com achados anteriores, já que a hiperlocomoção é um padrão comportamental dos animais SHR adultos, e já pode então ser detectado na infância (Sagvolden et al., 2005; Sagvolden; Pettersen; Larsen, 1993). Dados mais recentes revelaram que machos SHR exibiram hiperatividade no teste CA quando avaliados entre o 30º até 50º DPN e com um padrão de comportamento do tipo ansioso. Porém a idade dos animais é diferente do nosso trabalho, e os autores utilizaram um único aparato para a avaliação do comportamento (Tsai et al., 2017).

No teste do LCE, mais visitas aos braços abertos foram observadas para os animais machos SHR do que nos outros grupos (fêmeas SHR e animais controle). Os animais SHR de ambos os sexos permaneceram mais tempo nos braços fechados do que a cepa controle WKY. A interpretação dos comportamentos observados no LCE com mais visitas e tempo menor nos braços abertos referem-se a um comportamento ansioso, enquanto o maior tempo e mais visitas nos braços fechados se correlacionam além da ansiedade, com a atividade locomotora (Cruz; Frei; Graeff, 1994; Ramos et al., 1997). Portanto, os animais SHR apresentaram um comportamento do tipo mais ansioso neste aparato. Entretanto, têm sido documentado que o comportamento do tipo ansioso observado nos animais infantis do modelo do TDAH é atenuado ao longo do tempo quando comparado a linhagem controle WKY (Duran et al., 1999; Langen; Dost, 2011; Ramos et al., 2002; Zubevic et al., 2018). Já no estudo de Langen; Dost (2011) mostrou que ratos SHR permaneciam mais tempo nos braços abertos no LCE, o que indicava um comportamento menos ansioso do que os ratos WKY.

No TCE a permanência no compartimento claro foi menor nos animais de ambos os sexos do modelo do TDAH, e a latência para entrar no compartimento escuro também foi menor do que as fêmeas da cepa controle WKY. A hiperatividade foi observada somente nos machos SHR pelo aumento no número de cruzamentos entre os compartimentos em relação às fêmeas SHR e os animais WKY. Além disso, os machos SHR apresentaram aumento na avaliação de risco, o que sugere um comportamento mais ansioso. O TCE é baseado em um conflito de aproximação e evasão entre a exploração de novos ambientes e a aversão natural dos roedores a espaços abertos e iluminados (Crawley, 1985).

Outros autores avaliaram o perfil de ansiedade nos animais SHR adultos, em um aparato que compartilha os três testes de ansiedade (CA, LCE e TCE), comparando-os com a cepa Lewis (cepa consanguínea do SHR, já conhecida por apresentar perfil mais ansioso), e os animais SHR demonstraram um perfil menos ansioso nos testes integrados (Ramos et al., 2008).

Em outras cepas de animais, os comportamentos relacionados a ansiedade podem variar ao longo da vida, por exemplo, na fase de adolescência apresentam menor avaliação de risco em um ambiente novo e aversivo quando comparados com animais adultos (Arrant et al., 2013; Casey; Jones; Hare, 2008; Ernest; Pine; Hardin, 2006). No período que corresponde a infância dos animais é plausível que estas variações do perfil ansioso também possam estar ocorrendo. No presente estudo, os animais do modelo do TDAH infantis apresentaram um perfil mais ansioso.

Os sintomas exacerbados de ansiedade estão associados a dificuldades acadêmicas e sociais (Mychailyszyn; Méndez; Kendall, 2010; Wehmeier; Schacht; Barkley, 2010). O TDAH ocorre geralmente em conjunto com uma ou mais comorbidade com sintomas internalizantes (Transtorno Depressivo Maior, Transtorno de Ansiedade Generalizada) e / ou externalizantes (Transtorno Desafiador de Oposição e Conduta) (Jensen, et al., 2001). Portanto, nossos dados com o modelo experimental corroboram com os achados clínicos. Nossos resultados mostraram que os machos infantis SHR exibiram hiperatividade e ambos os sexos apresentaram respostas que indicam uma exacerbação do comportamento do tipo ansioso quando comparados à cepa controle.

A cafeína pode desencadear efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos dependendo do teste empregado, da espécie e do sexo (Hughes; Hancock,

2016; Rosa et al., 2018). Os efeitos ansiogênicos da cafeína estão bem documentados tanto em animais e seres humanos (Bhattacharya; Satyan; Chakrabarti, 1997; El Yacoubi et al., 2000; Rogers et al., 2005, 2006). Entre os animais SHR de ambos os sexos, o tratamento com cafeína não induziu diferenças nos testes comportamentais avaliados. Os efeitos ansiogênicos da cafeína foram evidentes somente nos animais WKY pela diminuição na latência para entrar no compartimento escuro. O efeito ansiolítico da cafeína foi observado por outros autores em ratos Sprague Dawley quando a cafeína foi administrada (20 mg/kg, via sonda intragástrica) do 2º- 6º DPN provocando uma diminuição no comportamento relacionado à ansiedade nos testes do LCE e TCE no 37º- 42º DPN (Pan; Chen, 2007). Outros autores realizaram o tratamento com cafeína em ratos Wistar (15 - 45 mg/kg, via sonda intragástrica) do 7º ao 27º DPN, a cafeína teve leve efeito ansiolítico no TCE e CA quando testados nos 28º- 30º DPN (Chagas et al., 2018). A administração crônica da cafeína via intraperitoneal (50 mg / kg) ou o consumo na água potável (0,3 g / L) por 8 dias ou 2 meses induziu efeitos semelhantes à ansiedade no LCE (El Yacoubi et al., 2000).

Em nosso trabalho foi possível observar que o tratamento com a cafeína apresentou efeitos distintos de acordo com a linhagem no teste do claro-escuro, promovendo efeito ansiogênico somente nos animais da cepa controle, no período que corresponde a infância.

A cafeína não alterou a hiperlocomoção apresentada pelos animais infantis SHR. Durante essa fase do desenvolvimento, os animais são mais propensos a explorar o meio ambiente, pois é o período em que estão deixando

o ninho e o comportamento naturalmente mais ansioso, característico dos roedores, se desenvolverá com o tempo.

Embora o metilfenidato seja o medicamento mais utilizado no tratamento do TDAH, existe a preocupação de que o tratamento possa complicar ou interferir nos outros sintomas associados ao TDAH. March e colaboradores, (2000) reportaram que crianças com TDAH e ansiedade responderam bem ao metilfenidato, e outros relatos também documentaram melhora da ansiedade comórbida com a farmacoterapia do TDAH (Barrickman et al., 1995; Geller et al., 2007; Snircova et al., 2016). Estudos com roedores, foi relatado que o tratamento pelo metilfenidato na adolescência desencadeia um comportamento relacionado à ansiedade na idade adulta (Bolaños et al., 2003; Vendruscolo et al., 2008). No entanto, em outro modelo experimental de TDAH, induzido por 6-OHDA, o tratamento com metilfenidato não afetou o comportamento ansioso dos animais (Bouchatta et al., 2018).

3.2 Os neurônios do córtex frontal do modelo de TDAH apresentaram atrasos nos padrões de diferenciação e no alongamento axonal.

Na segunda parte deste trabalho foram descritas pela primeira vez as alterações morfológicas durante o desenvolvimento *in vitro* de neurônios do córtex frontal do modelo animal mais estudado do TDAH. Embora o TDAH venha sendo diagnosticado também na população adulta, ele é um transtorno do neurodesenvolvimento. Os estudos de neuroimagem mostram diferenças estruturais e funcionais em algumas regiões cerebrais, com abordagens longitudinais que permitiram elucidar diferenças ao longo do desenvolvimento (Shaw et al., 2013).

Foi possível detectar com a análise da proteína marcadora da região somatodendrítica - MAP-2 - e da proteína axonal - tau - que esses neurônios apresentaram menos ramificação, menor comprimento máximo dos neuritos e consequente diminuição na imunoreatividade da proteína axonal tau. Uma vez que não houve alteração no número de raízes, ou seja, nos neuritos primários, as alterações encontradas nestes neurônios oriundos do córtex frontal do modelo do TDAH, revelam que eles apresentam distúrbios nos estágios mais maduros da diferenciação neuronal, e não em estágios imaturos.

A MAP-2 é um receptor neuroesteróide importante para a polimerização e estabilização dos microtúbulos no crescimento dos neuritos, enquanto a tau é uma proteína associada aos microtúbulos envolvida na manutenção do transporte axonal que ajuda a manter o funcionamento e viabilidade de neurônios (Dehmelt; Halpain, 2005; Fontaine-Lenoir et al., 2006). A diferenciação neuronal é um processo fundamental para que os neurônios adquiram sua morfologia funcional que consiste em um único axônio e múltiplos dendritos, permitindo aos neurônios receber, processar e transmitir informações de maneira unidirecional. Durante o desenvolvimento do SNC, a migração neuronal é essencial para garantir o posicionamento adequado de neurônios no cérebro maduro, e a mobilidade celular desempenha um papel fundamental durante o desenvolvimento embrionário (Marín e Rubenstein, 2003). Adicionalmente, problemas na migração e morfologia celular podem resultar em anormalidades cerebrais que levam às disfunções observadas em neuropatologias (Ross e Walsh, 2001; Bielas *et al.*, 2004).

Outra alteração também observada nos neurônios do modelo animal do TDAH foi a redução na imunoreatividade da proteína tau, o que sugere uma

alteração nos axônios desses neurônios. A proteína tau é expressa principalmente nos neurônios promovendo sua estabilização e estando envolvida também na proliferação de neuritos (Lee e Rook, 1992; Hernández et al., 2002). Apesar de a proteína tau desempenhar papel fisiológico nos dendritos (Ittner et al., 2010; Merino-Serrais et al., 2013), ela é predominantemente encontrada em axônios neuronais (Binder et al., 1985; Hirokawa et al., 1996). Em um estudo preliminar, altos níveis da proteína tau foram encontrados no soro de 25 crianças diagnosticadas com TDAH, isso pode implicar em distúrbios no transporte de microtúbulos e danos axonais dos neurônios desses indivíduos (Cetin e Simsek, 2017). Em camundongos *knockout* da expressão da proteína tau, os animais apresentaram hiperatividade (Ikegami; Harada; Hirokawa, 2000) e outro estudo observou que a estabilidade e organização dos microtúbulos foi alterada (Harada et al., 1994).

As alterações que foram observadas nos neurônios do córtex frontal dos animais no modelo do TDAH podem ser traduzidas com o atraso na maturação cortical especificamente nas áreas mais pré-frontais e suas conexões com outras áreas do cérebro, observados em estudos de neuroimagem em pacientes com TDAH (Shaw et al., 2007). Além disso, durante desenvolvimento, o CPF de pacientes com TDAH mostram alterações na substância branca, sugerindo déficits na orientação do axônio (D'Agati et al., 2010; Xia et al., 2012; Hart et al., 2014); na conectividade dopaminérgica e noradrenérgica com o cerebelo e o estriado (Leo et al., 2003; Biederman, 2005; Arnsten, 2006; Miller et al., 2014) e na sinaptogênese que influencia as propriedades eletrofisiológicas e o funcionamento dos neurônios do CPF (Fossella et al., 2003; Kenar et al., 2014).

Até o presente momento, os efeitos da cafeína e dos receptores de adenosina não tinham sido investigados diretamente nos neurônios do modelo animal do TDAH. Primeiramente, não foram encontradas modificações significativas no imunoconteúdo dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} nos neurônios do córtex frontal entre as linhagens controle e do modelo do TDAH, nos dias 2^o e 5^o dias *in vitro* (DIV). É de notar que o receptor A_{2A} foi quase indetectável no 5^o DIV. Portanto, modificações na densidade desses receptores não estariam associadas às alterações morfológicas observadas nos neurônios do modelo do TDAH. Os receptores de adenosina foram detectados em outro estudo com culturas de neurônios do córtex oriundos de uma linhagem de ratos diferente do nosso trabalho, com os receptores A₁ localizados na região do corpo celular enquanto os receptores A_{2A} estavam principalmente localizados nos terminais nervosos (Rebola et al., 2005).

Este é o primeiro estudo demonstrando a presença dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} em neurônios corticais do modelo do TDAH, embora os receptores de adenosina, principalmente os receptores A₁, já tenham sido identificados nos nervos simpáticos da artéria mesentérica (Rocha-Pereira et al., 2013), no nervo vago (Krstew; Jarrott; Lawrence, 1998), no núcleo do trato solitário destes animais (Carrettiero; Fior-Chadi, 2004). A presença de receptores de adenosina A_{2A} foi detectada nos terminais nervosos frontocorticais em animais adultos SHR (Pandolfo et al., 2013), mas até o momento não foram relatadas modificações nos receptores de adenosina neste modelo do TDAH.

3.3 A cafeína e o agonista do receptor A_{2A} restauram a ramificação e extensão do neuritos nos neurônios do modelo de TDAH.

Alguns estudos já documentaram os efeitos benéficos da cafeína no modelo experimental do TDAH, revertendo o prejuízo em tarefas de memória e atenção (Nunes et al., 2018; Pandolfo et al., 2013; Pires et al., 2010; Prediger et al., 2005). Neste estudo mostramos que a cafeína foi capaz de aumentar o número de pontos de ramificação, comprimento total e comprimento do maior neurito nos neurônios do modelo de TDAH, sem efeito sobre a proteína axonal tau, sugerindo que seus efeitos foram direcionados para os estágios mais maduros do desenvolvimento neuronal.

Os efeitos da cafeína nos neurônios do TDAH não foram reproduzidos pelo DPCPX, antagonista seletivo dos receptores de adenosina A_1 , corroborando com outros dados em que a diferenciação celular de neuroblastoma e neurônios cultivados do estriado não foram afetados pelo antagonismo seletivo dos receptores A_1 (Canals et al., 2005). A ativação dos receptores de adenosina A_1 pelo CPA promoveu menos ramificação nos neurônios da cepa controle WKY, efeito já observado em estudos anteriores utilizando outra cepa de animais (Thevananther et al., 2001), mas nenhum efeito foi observado nos neurônios SHR. Porém, em outro estudo cujo objetivo foi avaliar a neurotoxicidade pelo ácido caínico, a cultura de neurônios corticais não apresentou modificações significativas pela ativação dos receptores de adenosina A_1 (Rebola et al., 2005).

Considerando que a ativação dos receptores de adenosina A_{2A} promove o alongamento axonal e ramificação dendrítica em neurônios estriatais e corticais (Canals et al., 2005; Ribeiro et al., 2016), esses achados corroboram com os nossos resultados em que o agonista do receptor A_{2A} foi mais eficiente

em prevenir as alterações nas ramificações dos neuritos no modelo do TDAH, e não teve efeito evidente nos neurônios da linhagem controle. Por outro lado, o antagonismo seletivo dos receptores A_{2A} recuperou a ramificação dos neuritos nos neurônios SHR. No entanto, em um estudo anterior, não foi observado efeito sobre os parâmetros morfométricos em culturas primárias de neurônios com um antagonista seletivo A_{2A} (Ribeiro et al., 2016). Apesar de verificarmos o efeito do antagonismo dos receptores A_{2A} sobre os neuritos, a cafeína foi superior. Em todos os tratamentos analisados em nosso trabalho, o único parâmetro morfológico que permaneceu inalterado foi o número de raízes.

Quando avaliamos a imunorreatividade da proteína tau no 5º DIV, o antagonismo seletivo dos receptores A_{2A} foi o único eficiente na recuperação do crescimento axonal dos neurônios do TDAH, diferentemente do que foi observado nas fases mais precoces do desenvolvimento dos neurônios (compartimento somatodendrítico). A cafeína e o bloqueio ou a ativação seletiva dos receptores A_{2A} recuperam o crescimento e diferenciação dos neurônios SH de acordo com o compartimento neuronal. Nossos achados sugerem que o bloqueio simultâneo de ambos os receptores pela cafeína ou ativação seletiva dos receptores A_{2A} favorece a ramificação dendrítica, mas não o restabelecimento do crescimento axonal. Em consonância com nossos resultados, um estudo que investigou o perfil de expressão gênica de neurônios derivados de células-tronco neuroepiteliais humanas incubados com cafeína (3 μ M e 10 μ M), demonstrou regulação positiva nos genes envolvidos nos processos de desenvolvimento neuronal, porém regulação negativa nos genes nos processos de extensão do axônio (Yu et al., 2017). É importante ressaltar que o efeito da cafeína sobre os parâmetros morfométricos foi observado

somente nos neuritos do modelo do TDAH, pois na linhagem controle não houveram alterações significativas após o tratamento com a cafeína, similar a outro estudo recente em que o comprimento médio dos neuritos de camundongos que foram tratados com cafeína por 5 dias não foi alterado (Li et al., 2019).

Neste trabalho, para caracterizar o impacto da cafeína nos neurônios corticais do modelo do TDAH, foi utilizado 30 μM de cafeína, cuja faixa de concentração está dentro da faixa atingida no cérebro após consumo moderado de cafeína (20–70 μM) (Ardais et al., 2016; Costenla; Cunha; de Mendonça, 2010; Dall'Igna et al., 2007; Duarte et al., 2012), e que são semelhantes às concentrações plasmáticas de cafeína que causam respostas psicoativas em seres humanos (Bruce et al., 1986). Diferentemente dos efeitos da cafeína e dos receptores de adenosina no encéfalo adulto, os seus efeitos sobre o encéfalo em desenvolvimento ainda não estão completamente elucidados. A administração neonatal da cafeína causou um aumento persistente no comprimento dendrítico nos neurônios piramidais do CPF, sem impacto sobre a atividade locomotora (Juárez-Méndez, et al., 2006). Por outro lado, a cafeína administrada durante período embrionário foi capaz de aumentar transitoriamente os núcleos imunorreativos para NeuN e a proteína Sonic Hedgehog (Shh), mas diminuiu o imunoconteúdo de BDNF no córtex (Mioranza et al., 2014). Além disso, a cafeína via receptor A_{2A} promoveu a migração e a inserção tardia de neurônios do ácido γ -aminobutírico (GABA) no hipocampo em desenvolvimento, o que se refletiu em um aumento geral na atividade da rede neuronal provocando episódios convulsivos na idade adulta (Silva et al., 2013).

A adenosina desempenha um papel crucial em funções fisiológicas no sistema nervoso central, atuando como um neuromodulador. A adenosina via os receptores A_1 e A_{2A} regula a excitabilidade neuronal, transmissão e plasticidade sináptica (Cunha, 2005; Cunha et al., 2008). Em relação aos efeitos observados do receptor A_{2A} uma explicação reside no fato de que este receptor desempenha papéis diferentes no processo de diferenciação neuronal. A ativação dos receptores A_{2A} promove a arborização neuronal dos neuritos dependente da sinalização endógena do BDNF, induz alongamento axonal por meio de um mecanismo dependente das vias de sinalização PI3K, MAPK/Erk e Fosfolipase-C (PLC), mas não pela via cAMP/PKA ou BDNF endógeno (Ribeiro et al., 2016).

3.4 A cafeína e agonista do receptor A_{2A} via sinalização da PKA e PI3K restabelecem crescimento dos neuritos do modelo do TDAH.

A fim de investigar vias de sinalização clássicas operadas pelos receptores de adenosina A_{2A} no compartimento somatodendrítico e axonal dos neurônios do TDAH, mas também vias que participam do crescimento e diferenciação neuronal, investigou-se a participação da via PKA e PI3K nas diferenças observadas para cafeína e os receptores de adenosina A_{2A} . Além de participar do sistema transdução canônica operada pelos receptores de adenosina A_{2A} (Fredholm, 2001), a sinalização da PKA também está envolvida no crescimento de neuritos (Cabell e Audesirk, 1993; Kao et al., 2002; Koschinski e Zaccolo, 2017; Song e Pool, 1999). A via de sinalização PI3K é essencial para o alongamento axonal (Garrido et al., 2007), pois promove a polaridade neuronal e a extensão dos neuritos (Sanchez et al., 2001; Shi; Jan;Jan, 2003; Shi et al., 2004).

Neste trabalho, verificou-se que no segundo dia *in vitro* na presença do inibidor da PKA (KT5720), a cafeína segue aumentando os pontos de ramificação, mas o seu efeito sobre o alongamento do comprimento total e máximo dos neuritos dos neurônios do modelo do TDAH foi bloqueado pelo inibidor da PKA. O efeito da cafeína em estimular a atividade da PKA já foi previamente reportado em um modelo experimental da doença de Alzheimer em camundongos (Zeitlin et al., 2001). Em relação aos efeitos do agonista A_{2A} , a presença do inibidor da PKA atenua o seu efeito em aumentar a porcentagem de pontos de ramificação e apresentou forte tendência a bloquear os efeitos do (CGS 21680) sobre o comprimento total e máximo comprimento do neuritos nos neurônios do modelo de TDAH, o que corrobora com os achados de Canals e colaboradores, 2005.

A atividade da via PI3Ks é essencial para o desenvolvimento, alongamento e a manutenção do axônio (Sanchez et al., 2001; Shi; Jan; Jan, 2003), regulando a neuritogênese e axonogênese (Shi; Jan; Jan, 2003; Sosa et al., 2006). De acordo com os nossos resultados, a presença do inibidor da PI3K (LY294002) (Dijkhuizen e Ghosh, 2005) aboliu os efeitos da cafeína sobre o número de pontos de ramificação, comprimento total e máximo dos neuritos dos neurônios do modelo de TDAH. De acordo com dados anteriores, outros autores verificaram que o efeito citoprotetor da cafeína foi abolido pelo inibidor da PI3K em células SH-SY5Y de neuroblastoma dopaminérgico humano como modelo de Doença de Parkinson (DP) (Nakaso; Ito; Nakashima, 2008). O inibidor da PI3K não teve impacto evidente sobre o efeito tratamento com o agonista A_{2A} no número de pontos de ramificação. No entanto, os efeitos do CGS sobre o comprimento total e máximo dos neuritos foram bloqueados na presença de

inibidor de PI3K em neurônios do modelo de TDAH, algo já reportado em neurônios corticais de ratos de outra linhagem em que na presença do inibidor da PI3K, o efeito do CGS 21680 sobre comprimento máximo dos neuritos e alongamento axonal é abolido (Ribeiro et al., 2016). Portanto, a sinalização de PKA e PI3K está envolvida no alongamento de neuritos promovido pela cafeína e pelo agonista A_{2A} nos neurônios do TDAH, enquanto o aumento da ramificação dos neuritos pela cafeína depende somente da PI3K, a ramificação dos neuritos mediada pela ativação de A_{2A} depende apenas da PKA.

3.5 O bloqueio dos receptores A_{2A} recupera o crescimento axonal via sinalização PI3K nos neurônios modelo do TDAH

No quinto dia *in vitro*, os neurônios do modelo de TDAH apresentaram diminuição da imunorreatividade da tau, e o efeito mais proeminente em recuperar este padrão de crescimento axonal foi pelo antagonista seletivo do receptor A_{2A} (SCH 58261). Com o objetivo de identificar qual das vias estudadas para o compartimento somatodendritido estava envolvida, em outro conjunto de experimentos observamos que o SCH 58261 foi capaz de restaurar o crescimento axonal nos neurônios do TDAH e foi claramente dependente da via da PI3K e não da via clássica operada pelos receptores A_{2A} que é a da PKA. Estes achados que mostram a não participação da via clássica já foram documentados anteriormente. É relativamente bem documentado que o bloqueio dos receptores de adenosina A_{2A} protege neurônios cultivados da neurotoxicidade de diferentes insultos (Dall'Igna et al., 2003; Boeck et al., 2007; Silva et al., 2007; Nobre et al., 2010), e também que o antagonista seletivo de A_{2A} preveniu a sinaptotoxicidade e perda da viabilidade em cultura de neurônios

hipocampais expostos ao A β 1-42 independente da via da PKA (Canas et al., 2009).

Nossos resultados indicaram uma importante participação da PI3K na recuperação do crescimento axonal induzida por SCH 58261 nos neurônios do modelo do TDAH, o que vai de acordo com os achados, onde o bloqueio da PI3K previne a iniciação axonal nos neurônios do hipocampo ou induz o colapso do cone de crescimento e retração do neurito (Sanchez et al., 2001), demonstrando o papel da atividade de PI3K no alongamento axonal.

A polarização e a diferenciação neuronal são processos fundamentais para que os neurônios adquiram sua morfologia funcional. A formação e manutenção dos axônios e dendritos são cruciais para a funcionalidade, o desenvolvimento e a fisiologia normal do sistema nervoso central (Barnes e Polleux, 2009; Sakakibara e Hatanaka, 2015). As anormalidades nesses processos podem levar às disfunções que estão associadas aos distúrbios do desenvolvimento neurológico, como autismo e esquizofrenia (Bakhshi; Chance, 2015; Pilz et al., 2002; Wegiel et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram a primeira evidência de alterações morfológicas significativas no córtex frontal de neuritos dos neurônios do modelo do TDAH com administração de cafeína e a manipulação dos receptores de adenosina A_{2A}. Além disso, nossos achados contribuem para um crescente corpo de informações sobre o efeito da cafeína e dos receptores de adenosina A_{2A} no TDAH. As alterações morfométricas encontradas nos neurônios e axônios do córtex frontal do modelo animal do TDAH podem estar relacionadas com os

achados de neuroimagem dos pacientes com TDAH, cuja maturação cortical foi detectada como sendo mais lenta e cujo padrão normal de maturação é alcançado somente no final da adolescência (Shaw et al., 2007).

Destacamos aqui pela primeira vez, o papel da cafeína e dos receptores de adenosina A_{2A} no desenvolvimento dos neuritos e axônios do modelo animal do TDAH, e, portanto, esses receptores podem ser considerados como um alvo farmacológico para o tratamento deste transtorno. A manipulação farmacológica dos receptores A_{2A} pode promover mudanças morfológicas neuronais com impacto na função de circuitos neuronais por reestabelecer o crescimento neuronal nos neurônios do TDAH. A cafeína e o antagonista A_{2A} reforçam uma estratégia terapêutica adjuvante para o tratamento deste distúrbio, pois novas alternativas para o tratamento do TDAH requerem investigação, já que aproximadamente 30% dos pacientes com TDAH apresentam pouca ou nenhuma melhora sintomática após receber intervenção com psicoestimulantes como o metilfenidato. Os efeitos colaterais pronunciados também dificultam a continuidade do tratamento com este psicoestimulante.

Nossos dados também permitiram a preocupação em incorporar estudos com análise do dimorfismo sexual vem sendo destaque para as novas diretrizes em estudos experimentais, que preconizam a incorporação do sexo como uma variável biológica (Shansky e Woolley, 2016). Nossos achados revelaram uma antecipação do comportamento do tipo ansioso nos animais infantes do modelo de TDAH, permitindo examinar esta comorbidade e investigá-la na infância que é um período importante não só no TDAH, mas também em outros transtornos neuropsiquiátricos.

REFERÊNCIAS

Alçada-Morais, S.; Gonçalves, N.; Moreno-Juan, V.; Andres, B.; Ferreira, S.; Marques, J. M.; Magalhães, J.; Rocha, M.M.J.; Xu, X.; Partidário, M.; Cunha, A.R.; López-Bendito, G.; Rodrigues, R. J. Adenosine A2A receptors contribute to the radial migration of cortical projection neurons through the regulation of neuronal polarization and axon formation. **Cerebral Cortex**, v. 31, n. 12, p. 5652-5663. 2021.

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Washington, DC: **American Psychiatric Association**; 2013

Ardais, A.P.; Rocha, A. S.; Borges, M. F.; Fioreze, G. T.; Sallaberry, C.; Mioranza, S.; Nunes, F.; Pagnussata, N.; Botton, P.H.; Cunha, R. A.; Porciúncula, L.O. Caffeine exposure during rat brain development causes memory impairment in a sex selective manner that is offset by caffeine consumption throughout life. **Behavioural Brain Research**, v. 303, p. 76-84, 2016.

Ardais, A.P.; Borges, M.F.; Rocha, A.S., Sallaberry, C., Cunha, R.A., Porciúncula, L.O. Caffeine triggers behavioral and neurochemical alterations in adolescent rats. **Neuroscience**, v. 270, p. 27-39, 2014.

Arnaud, M.J. Identification, kinetic and quantitative study of [2-14C] and [1-Me-14C] caffeine metabolites in rat's urine by chromatographic separations. **Biochemia Medica**, v. 16, p. 67–76, 1976.

Arnaud, M.J.; Welsch, C. Theophylline and caffeine metabolism in man. In: Theophylline and other Methylxanthines/Theophyllin und andere Methylxanthine, **Methods in Clinical Pharmacology**, v. 3, p. 135-148, 1982.

Arnold, L.E. Sex differences in ADHD: Conference summary. **Journal of abnormal child psychology**, v. 24, n. 5, p. 555-569, 1996.

Arnsten, A.F. Fundamentals of attention-deficit/hyperactivity disorder: circuits and pathways. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 67, p. 7–12, 2006.

Arnsten, A.F. Toward a new understanding of attention-deficit hyperactivity disorder pathophysiology. **CNS drugs**, v. 23, n. 1, p. 33-41, 2009.

Arnsten, A.F.; Rubia, K. Neurobiological circuits regulating attention, cognitive control, motivation, and emotion: disruptions in neurodevelopmental psychiatric disorders. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 51, p. 356-367, 2012.

Arrant, A.E.; Schramm-Sapyta, N.L.; Kuhn, C.M. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 119-127, 2013.

Arruda, M. A.; Querido, C. N.; Bigal, M. E.; Polanczyk, G. V. ADHD and mental health status in Brazilian school-age children. **Journal of Attention Disorders**, v. 19, n. 1, p.11-17, 2012.

Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) (2020) Indicadores da indústria de café no Brasil. Disponível em: <<http://abic.com.br/estatisticas/>>. Acesso em julho de 2020.

Barone, J.J.; Roberts, H.R. Caffeine consumption. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 119-129, 1996.

Baer, R.A. Effects of caffeine on classroom behavior, sustained attention, and a memory task in preschool children. **Journal of Applied Behavior Analysis**, v. 20, p. 225–234, 1987.

Bakhshi, K., Chance, A. Neuropathology of Schizophrenia: a selective review of past studies and emerging themes in brain structure and cytoarchitecture. **Neuroscience**, v. 303, p. 82–102, 2015.

Banerjee, T.D.; Middleton, F.; Faraone, S. V. Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. **Acta Paediatrica**, v. 96, p.1269-1274, 2007.

Barkley, R.A, Russell, A. Attention-deficit hyperactivity disorder: A handbook for diagnosis and treatment. **Guilford Publications**, New York, 2014.

Barnes, A.P.; Lilley, B.N.; Pan, Y.A.; Plummer, L.J.; Powell, A.W.; Raines, A.N., Polleux, F. LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. **Cell**, v. 129, n. 3, p. 549-563, 2007.

Barnes A.P., Polleux F. Establishment of axon–dendrite polarity in developing neurons. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, p. 347-381, 2009.

Barrickman, L.L.; Perry, P.J.; Allen, A.J., Kuperman, S., Arndt, S.V., Herrmann, K.J., Schumacher, E. Bupropion versus methylphenidate in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 649–57, 1995.

Bellgrove, M. A., Hawi, Z., Gill, M., Robertson, I. H. The cognitive genetics of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): sustained attention as a candidate phenotype. **Cortex**, v. 42, n. 6, 838-845, 2006.

Bhattacharya, S.K., Satyan, K.S., Chakrabarti, A. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 11, p. 219–224, 1997.

Biederman, J.; Faraone, S.V. Attention-deficit hyperactivity disorder. **Lancet**, v. 366, 237–248, 2005.

Biederman, J.; Mick, E.; Faraone, S.V. Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptom type. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 5, p. 816-818, 2000.

Biederman, J.; Faraone, S.V. The effects of attention-deficit/hyperactivity disorder on employment and household income. **Medscape General Medicine**, v. 8, n. 3, p. 12, 2006.

Biederman, J.; Faraone, S.V.; Mick, E.; Williamson, S.; Wilens, T.E.; Spencer, T.J.; Weber, W.; Jetton J.; Kraus, I.; Pert, J.; Zallen, B. Clinical correlates of ADHD in females: findings from a large group of girls ascertained from pediatric and psychiatric referral sources. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.38, n. 8, p. 966-975, 1999.

Biederman, J.; Faraone, S.V.; Monuteaux, M.C.; Bober, M.; Cadogen, E. Gender effects on attention-deficit/hyperactivity disorder in adults, revisited. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 692-700, 2004.

Bizot, J. C.; Chenault, N.; Houzé, B.; Herpin, A.; David, S.; Pothion, S.; Trovero, F. Methylphenidate reduces impulsive behaviour in juvenile Wistar rats, but not in adult Wistar, SHR and WKY rats. **Psychopharmacology**, v. 193, n. 2, p. 215-223, 2007.

Boeck, C.R.; Kroth, E.H.; Bronzatto, M.J.; Vendite, D. Effect of the L- or D-aspartate on ecto-5'-nucleotidase activity and on cellular viability in cultured neurons: participation of the adenosine A2A receptors. **Amino Acids**, v. 33, 439–444, 2007.

Bolaños, C.A.; Barrot, M.; Berton, O.; Wallace-Black, D.; Nestler, E.J. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. **Biological Psychiatry**, v. 54, p. 1317–1329, 2003.

Bonati, M.; Latini, R.; Galletti, F.; Young, J.F.; Tognoni, G.; Garattini, S. Caffeine disposition after oral doses. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 32, p. 98–106, 1982.

Bonvicini, C.; Faraone, S.V.; Scassellati, C. Attention-deficit hyperactivity disorder in adults: a systematic review and meta-analysis of genetic, pharmacogenetic and biochemical studies. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 7, p. 872- 884, 2016.

Botton, P;H.; Pochmann, D.; Rocha, A.S; Nunes, F.; Almeida, A.S; Marques, D.M. Porciúncula, L.O. Aged mice receiving caffeine since adulthood show distinct patterns of anxiety-related behavior. **Physiology & Behavior**, v. 170, p. 47-53, 2017.

Bouchatta, O.; Manouze, H.; Bouali-Benazzouz, R., Kerekes, N.; Ba- M'hamed S.; Fossat, P.; Landry, M.; Bennis, M. Neonatal 6-OHDA lesion model in mouse induces Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder (ADHD)-like behavior, **Scientific Reports**. v. 8, p. 153- 149, 2018.

Bradke, F.; Dotti, C.G. The role of local actin instability in axon formation. **Science**, v. 283, p. 1931-1934, 1999.

Bruce, M.; Scott, N.; Lader, M.; Marks, V. The psychopharmacological and electrophysiological effects of single doses of caffeine in healthy human subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 22, p. 81–87, 1986.

Cabell, L.; Audesirk, G. Effects of selective inhibition of protein kinase C, cyclic AMPdependent protein kinase, and Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase on neurite development in cultured rat hippocampal neurons. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 11, p. 357–368, 1993.

Canals, M.; Angulo, E.; Casadó, V.; Canela, E.I.; Mallol, J.; Viñals, F.; Staines, W.; Tinner, B.; Hillion, J.; Agnati, L.; Fuxe, K.; Ferré, S.; Lluís, C.; Franco, R. Molecular mechanisms involved in the adenosine A₁ and A_{2A} receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. **Journal of Neurochemistry**, v. 92, p. 337-48, 2005.

Canas, P.M.; Porciúncula, L.O.; Cunha, G.M.; Silva, C.G.; Machado, N.J.; Oliveira, J.M.; Oliveira, C.R.; Cunha, R.A. Adenosine A_{2A} receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogenactivated protein kinase pathway. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 14741–14751, 2009.

Carey, M.P.; Diewald, L.M.; Esposito, F.J.; Pellicano, M.P.; Carnevale, U.A.G.; Sergeant, J.A.; Papa, M.; Sadile, A.G. Differential distribution, affinity and plasticity of dopamine D-1 and D-2 receptors in the target sites of the mesolimbic system in an animal model of ADHD. **Behavioural Brain Research**, v. 94, n. 1, p. 173-185, 1998.

Carrettiero, D.C.; Fior-Chadi, D.R. Adenosine A₁ receptor distribution in the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Journal of Neural Transmission**, v. 111, n. 4, p. 465-473, 2004.

Casey, B.J.; Tottenham, N.; Fossella, J. Clinical, imaging, lesion, and genetic approaches toward a model of cognitive control. **Developmental Psychobiology**, v. 40, n. 3, p. 237–254, 2002.

Casey, B.J.; Jones, R.M.; Hare, T.A. The adolescent brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1124, p. 111-126, 2008.

Casey, B.J.; Tottenham, N.; Liston, C.; Durston, S. Imaging the developing brain: what have we learned about cognitive development? **Trends in Cognitive Science**, v. 9, n. 3, 104–110, 2005.

Dalsgaard S, Østergaard SD, Leckman JF, Mortensen PB, Pedersen MG. Mortality in children, adolescents, and adults with attention deficit hyperactivity disorder: a nationwide cohort study. **Lancet**, v. 385, p. 2190-2106, 2015.

Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **JAMA**, v. 288, p. 1740-1748, 2002.

Castellanos, F.X.; Giedd, J.N.; Berquin, P.C.; Walter, J.M.; Sharp, W.; Tran, T.; Vaituzis, A.C.; Blumenthal, J.D.; Nelson, J.; Bastain, T.M.; Zijdenbos, A.; Evans, A.C.; Rapoport, J.L. Quantitative brain magnetic resonance imaging in girls with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Archives Of General Psychiatry**, v. 58, n. 3, p. 289-295, 2001.

Castellanos, F.X.; Lee, P.P.; Sharp, W.; Jeffries, N.O.; Greenstein, D.K.; Clasen, L.S.; Blumenthal, J.D.; James, R.S.; Ebens, C.L.; Walter, J.M.; Zijdenbos, A.; Evans, A.C.; Giedd, J.N.; Rapoport, J.L. Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of the American Medical Association**, v. 288, p. 740–1748, 2002.

Cetin, I.; Simsek, S. A preliminary study on investigation of serum α -synuclein and tau protein levels in children with attention deficit hyperactivity disorder. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 285-291, 2017.

Chagas, C.L.; Benevides, R.D.D.L.; Bezerra, C. M.; Abadie-Guedes, R.; Guedes, R.C. Ponderal, Behavioral, and Brain Electrophysiological Effects of Caffeine on the Immature Rat. **Journal of Caffeine and Adenosine Research**, v. 8, n. 4, p. 153-161, 2018.

Chen, J.F.; Xu, K.; Petzer, J.P.; Staal, R.; Xu, Y.H.; Beilstein, M.; Sonsalla, P.K.; Castagnoli, K.; Castagnoli, N. Jr.; Schwarzschild, M.A. Neuroprotection by caffeine and A2A adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 10, 2001.

Cheffer, A.; Castillo, A.R.G.; Corrêa-Velloso, J.; Gonçalves, M.C.B.; Naaldijk, Y.; Nascimento, I.C.; Burnstock, G.; Ulrich, H. Purinergic system in psychiatric diseases. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 1, p. 94–106, 2018.

Chhabra E.S.; Higgs, H.N. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. **Nature Cell Biology**, v. 9, p. 1110-1121, 2007.

Childress, A.C.; Berry, S.A. Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder in adolescents. **Drugs**, v. 72, p. 309-325, 2012.

Cho, S.C.; Kim, H.W.; Kim, B.N.; Kim, J.W.; Shin, M.S.; Chung, S.; Cho, D.Y.; Jung, S.W.; Yoo, H.J.; Chung, I.W.; Chung, U.S.; Son, J.W. Gender-specific association of the brain-derived neurotrophic factor gene with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Psychiatry Investig**, v. 7, n. 4, p. 285-290, 2010.

Conners, C.K. A placebo-crossover study of caffeine treatment of hyperkinetic children. **International Journal of Mental Health**, v. 4, p. 132–143, 1975.

Conners, C.K. The acute effects of caffeine on evoked response, vigilance, and activity level in hyperkinetic children. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v. 7, p. 145–151, 1979.

Cortese, S. The neurobiology and genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): what every clinician should know. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 16, p. 422-433, 2012.

Costa, M.S; Botton, P.H.; Mioranza, S.; Souza, D.O.; Porciúncula, L.O. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. **Neuroscience**, v. 153, p. 1071-1078, 2008.

Costenla, A.R.; Cunha, R.A.; de Mendonça, A. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, (Suppl. 1), S25–S34, 2010.

Crawley, J.N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 9, p. 37-44, 1985.

Crichton A. An investigation into the nature and origin of mental disorder. In attention and its diseases” **Journal of Attention Disorders**, v.12 n. 3, p. 200–204, 2008.

Cruz, A.D.M.; Frei, F.; Graeff, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.

D'Agati, E.; Casarelli, L.; Pitzianti, M.B.; Pasini, A. Overflow movements and white matter abnormalities in ADHD. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, p. 441–445, 2010.

Dall'Igna, O.P.; Fett, P.; Gomes, M.W.; Souza, D.O.; Cunha, R.A.; Lara, D.R. Caffeine and adenosine A2A receptor antagonists prevent beta amyloid (25-35) induced cognitive deficits in mice. **Experimental Neurology**, v. 203, p. 241-245, 2007.

Danckaerts M, Sonuga-Barke EJ, Banaschewski T, Buitelaar J, Döpfner M, Hillis C, et al. The quality of life of children with attention deficit/hyperactivity disorder: a systematic review. **Eur Child Adolesc Psychiatry**, v.19, p. 83-105, 2010.

Da Silva, J.S.; Medina, M.; Zuliani, C.; Di Nardo, A.; Witke, W.; Dotti, C.G. RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. **The Journal of Cell Biology**, 162, n. 7, p. 1267-1279, 2003.

Dehmelt, L., Halpain, S. The MAP2/tau family of microtubule-associated proteins. **Genome biology**, v. 6, n. 1, p. 204, 2005.

Del-Ponte, B.; Santos, I.S.; Tovo-Rodrigues, L.; Anselmi, L.; Munhoz, T.N.; Matijasevich, A. Caffeine consumption during pregnancy and ADHD at the age of 11 years: a birth cohort study. **British Medical Journal Open**, v. 6(12):e012749, 2016.

Derks, E.M.; Hudziak, J.J.; Boomsma, Dorret I. Why more boys than girls with ADHD receive treatment: a study of Dutch twins. **Twin Research and Human Genetics**, v. 10, n. 5, p. 765-770, 2007.

Dirlikov, B., Rosch, K. S., Crocetti, D., Denckla, M. B., Mahone, E. M., Mostofsky, S. H. Distinct frontal lobe morphology in girls and boys with ADHD. **Neuroimage: Clinical**, v. 7, p. 222-229, 2015.

Dotti, C.G.; Sullivan, C.A.; Banker, G.A. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. **Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 1454-1468, 1988.

Duarte, J.M.; Agostinho, P.M.; Carvalho, R.A.; Cunha, R. A. Caffeine consumption prevents diabetes-induced memory impairment and synaptotoxicity in the hippocampus of NONcZNO10/LTJ mice. **Plos One**, v. 7, n. 4, p. 1-10, 2012.

El Yacoubi, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Costentin, J.; Vaugeois, J.M. The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A(2A) adenosine receptor antagonists. **Psychopharmacology (Berl)**, v.148, p. 153-163, 2000.

Elia, J.; Ambrosini, P.; Berrettini, W. ADHD characteristics: I. Concurrent comorbidity patterns in children & adolescents. **Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health**, v. 2, n.15, p.1-9, 2008.

El-Yazigi, A.; Shabib, S.; Al-Rawithi, S.; Yusuf, A.; Legayada, E.S.; Al-Humidan, A. Salivary clearance and urinary metabolic pattern of caffeine in healthy children in pediatric patients with hepatocellular disease. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, p. 366–372, 1999.

Ernst, M.; Liebenauer, L.L.; King, A. C.; Fitzgerald, G.A.; Cohen, R. M.; Zametkin, A.J. Reduced brain metabolism in hyperactive girls. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 33, n.6, p. 858-868, 1994.

Ernst, M.; Nelson, E.E.; McClure, E.B.; Monk, C.S.; Munson, S.; Eshel, N.; Zarah, E.; Leibenluft, E.; Zametkin, A.; Towbin, K.; Blair, J.; Charney, D.; Blair, J. Choice selection and reward anticipation: an fMRI study. **Neuropsychologia**, v. 4, n.12, p. 1585-1597, 2004.

Espinosa, J.; Rocha, A.; Nunes, F.; Costa, M.S.; Schein, V.; Kazlauskas, V.; Kalinine, E.; Souza, D.O.; Cunha, R.A.; Porciúncula, L.O. Caffeine Consumption Prevents Memory Impairment, Neuronal Damage, and Adenosine A2A Receptors Upregulation in the Hippocampus of a Rat Model of Sporadic Dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 34, n. 2, p. 509-518, 2013.

Faraone, S.V., Asherson, P.; Banaschewski, T.; Biederman, J.; Buitelaar, J.K.; Ramos-Quiroga, J.A.; Antoni., Rohde, L.A., Sonuga-Barke, E.J. Tannock, R., Franke, B. Attention-deficit/hyperactivity disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1-23, 2015.

Faraone, S.V.; Biederman, J.; Monuteaux, M.C. Further evidence for the diagnostic continuity between child and adolescent ADHD. **Journal of Attention Disorders**, v. 6, n. 1, p. 5-13, 2002.

Faraone, S.V., Larsson, H. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 24, n. 4, p. 562-575, 2018.

Faraone, S.V.; Mick E. Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 33, p. 159–180, 2010.

Fayyad J., De Graaf R., Kessler R., Alonso J., Angermeyer M., Demyttenaere K., De Girolamo G., Haro J.M., Karam E.G., Lara C., Lepine J.P., Ormel J., Posada-Villa J., Zaslavsky A.M., Jin R. Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. **British Journal of Psychiatry**, v. 190, p. 402–409, 2007.

Fayyad, J.; Sampson, N.A.; Hwang, I.; Adamowski, T.; Aguilar-Gaxiola, S.; Al-Hamzawi, A.; Andrade, L.H.; Borges, G.; de Girolamo, G.; Florescu, S.; Gureje, O.; Haro, J.M.; Hu, C.; Karam, E.G.; Lee, S.; Navarro-Mateu, F.; O'Neill, S.; Pennell, B.E.; Piazza, M.; Posada-Villa, J.; Ten Have, M.; Torres, Y.; Xavier, M.; Zaslavsky, A.M.; Kessler, R.C. The descriptive epidemiology of DSM-IV Adult ADHD in the world health organization world mental health surveys. **ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders**, v. 9, n. 1, p. 47-65, 2017.

Ferré, S. Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 10, 1963-1979, 2016.

Ferré, S.; Bonaventura, J.; Tomasi, D.; Navarro, G.; Moreno, E.; Cortés, A.; Lluís, C.; Casadó, V.; Volkow, N.D. Allosteric mechanisms within the adenosine A2A–dopamine D2 receptor heterotetramer. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 154-160, 2016.

Ferré, S.; Díaz-Ríos, M.; Salamone, J.D.; Prediger, R.D.S New Developments on the Adenosine Mechanisms of the Central Effects of Caffeine and Their Implications for Neuropsychiatric Disorders. **Journal of Caffeine and Adenosine Research**, v. 8, n. 4, 121-131, 2018.

Fontaine-Lenoir, V.; Chambraud, B.; Fellous, A.; David, S.; Duchossoy, Y.; Baulieu, E.E.; Robel, P. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 12, p. 4711-4716, 2006.

Fossella, J.A.; Sommer, T.; Fan, J.; Pfaff, D.; Posner, M.I. Synaptogenesis and heritable aspects of executive attention. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research**, v. 9, n. 3, p. 178-183, 2003.

França, A.P.; Schamne, M.G.; Souza, B.S.; Scheffer, L.D.; Bernardelli, A. K.; Corrêa, T.; Izídio, G. S.; Latini, A.; Silva-Santos, J. A.; Canas, P.; Cunha, R.A.; Prediger, R. D.Caffeine Consumption plus Physical Exercise Improves Behavioral Impairments and Stimulates Neuroplasticity in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): an Animal Model of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n 9, p. 3902-3919, 2020.

Franke, B.; Vasquez, A.A.; Johansson, S.; Hoogman, M.; Romanos, J.; Boreatti-Hummer, A.; Heine, M.; Jacob, C.P.; Lesch, K.P.; Casas, M.; Ribasés, M.; Bosch, R.; Sánchez-Mora, C.; Gómez-Barros, N.; Fernández-Castillo, N.; Bayés, M.; Halmøy, A.; Halletland, H.; Landaas, E.T.; Fasmer, O.B.; Knappskog, P.M.; Heister, A.J.; Kiemeneij, L.A.; Kooij, J.J, Boonstra, A.M, Kan, C.C.; Asherson, P.;

Faraone, S.V., Buitelaar, J.K.; Haavik, J.; Cormand, B.; Ramos-Quiroga, J.A.; Reif, A. Multicenter analysis of the SLC6A3/DAT1 VNTR haplotype in persistent ADHD suggests differential involvement of the gene in childhood and persistent ADHD. **Neuropsychopharmacology**, v.35, p. 656–664, 2010.

Fraser, L. M.; Brown, R.E.; Hussin, A.; Fontana, M.; Whittaker, A.; O'Leary, T. P.; Lederle, L.; Holmes, A.; Ramos, A. Measuring anxiety- and locomotion-related behaviours in mice: a new way of using old tests. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 211, p. 99-112, 2010

Fredholm, B.B. Methylxanthines. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 200, p. 268-293, 2011.

Fredholm, B.B.; Battig, K.; Holmen, J.; Nehlig, A.; Zvartau, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, v. 51, p. 83–133, 1999.

Gao, Q.; Liu, L.; Qian, Q.; Wang, Y. Advances in molecular genetic studies of attention deficit hyperactivity disorder in China. **Shanghai Archives of Psychiatry**, v. 26, p. 194–206, 2014.

Gaub, M; Carlson, C.L. Gender differences in ADHD: A meta-analysis and critical review. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 36, n. 8, p. 1036-1045, 1997.

Garfinkel, B.D.; Webster, C.D.; Sloman, L. Individual responses to methylphenidate and caffeine in children with minimal brain dysfunction. **Canadian Medical Association Journal**, v. 113, p. 729-732, 1975.

Garfinkel, B.D.; Webster, C.D.; Sloman, L. Responses to methylphenidate and varied doses of caffeine in children with attention deficit disorder. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 26, p. 395-401, 1981.

Garrido, J.; Simon, D.; Varea, O.; Wandosell, F. GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. **FEBS. Letters**, v. 581, p. 1579–1586, 2007.

Geller, D.; Donnelly, C.; Lopez, F.; Rubin, R.; Newcorn, J.; Sutton, V.; Bakken, R.; Paczkowski, M.; Kelsey, D.; Sumner, C. Atomoxetine treatment for pediatric patients with attention-deficit/hyperactivity disorder with comorbid anxiety disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 46, n. 9, p, 119-1127, 2007.

Gizer, I.R.; Ficks, C.; Waldman, I.D. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. **Human Genetics**, v. 126, n. 1, p. 51-90, 2009.

Hart, H.; Marquand, A.F.; Smith, A.; Cubillo, A.; Simmons, A.; Brammer, M.; Rubia, K. Predictive neurofunctional markers of attention-deficit/hyperactivity disorder based on pattern classification of temporal processing. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 53, n. 5, p. 569-578, 2014.

Harada, A.; Oguchi, K.; Okabe, S.; Kuno, J.; Terada, S.; Ohshima, T.; Sato-Yoshitake, R.; Takei, Y.; Noda, T.; Hirokawa, N. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. **Nature**, v. 369, p. 6480-6488, 1994.

Harvey, D.H.; Marsh, R.W. The effects of de-caffeinated coffee versus whole coffee on hyperactive children. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 20, p. 81-86, 1978.

Hasler, R.; Salzmann, A.; Bolzan, T.; Zimmermann, J.; Baud, P.; Giannakopoulos, P.; Perroud, N. DAT1 and DRD4 genes involved in key dimensions of adult ADHD. **Neurological Sciences**, v. 36, n. 6, p. 861-869, 2015.

Hawi, Z.; Cummins, T.D.; Tong, J.; Arcos-Burgos, M.; Zhao, Q.; Matthews, N.; Newman, D.P.; Johnson, B.; Vance, A.; Heussler, H.S.; Levy, S.; Easteal, S.; Wray, N.R.; Kenny, E.; Morris, D.; Kent, L.; Gill, M.; Bellgrove, R.A. Rare DNA variants in the brain-derived neurotrophic factor gene increase risk for attention-deficit hyperactivity disorder: a next-generation sequencing study. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n.4, p. 580- 584, 2017.

Heng, J.Ik-T.; Chariot, A.; Nguyen, L. Molecular layers underlying cytoskeletal remodelling during cortical development. **Trends in neurosciences**, v. 33, n. 1, p. 38-47, 2010.

Hoffmann, Heinrich. Struwwelpeter. Courier Corporation, 1995. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=3TUOxPXoxT0C&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em julho de 2019.

Hoogman, M.; Bralten, J.; Hibar, D.P.; Mennes, M.; Zwiers, M.P.; Schweren, L. S.; de Zeeuw, P. Subcortical brain volume differences of participants with ADHD across the lifespan: an ENIGMA collaboration. **The Lancet Psychiatry**, v. 4, n. 4, p. 310- 319, 2017.

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

Hinshaw, S.P.; Prospective follow-up of girls with attention-deficit/hyperactivity disorder into adolescence: Evidence for continuing cross-domain impairment. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 74, n. 3, p. 489-499, 2006.

Ikegami, S.; Harada, A.; Hirokawa, N. Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. **Neuroscience Letters**, v. 279, n. 3, p. 129-132, 2000.

Ivanov, I.; Murrough, J.W.; Bansal, R.; Hao, X.; Peterson, B.S. Cerebellar morphology and the effects of stimulant medications in youths with attention deficit-hyperactivity disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 3, p. 718-726, 2014.

Jacobs, T.; Causeret, F.; Nishimura, Y.V.; Terao, M.; Norman, A.; Hoshino, M.; Nikolić, M. Localized activation of p21-activated kinase controls neuronal polarity and morphology. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 32, p. 8604-8615, 2007.

Jensen, P.S.; Hinshaw, S.P.; Kraemer, H.C.; Lenora, N.; Newcorn, J.H.; Abikoff, H.B.; March, J.S.; Arnold, L.E.; Cantwell, D.P.; Conners, C.K.; Elliott, G.R.; Greenhill, L.L.; Hechtman, L.; Hoza, B.; Pelham, W.E.; Severe, J.B.; Swanson, J.M.; Wells, K.C.; Wigal, T.; Vitiello, B. ADHD comorbidity findings from the MTA study: comparing comorbid subgroups. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 40, n. 2, p. 147-158, 2001.

Joelsson, P., Chudal, R., Gyllenberg, D., Kesti, A. K., Hinkka-Yli-Salomäki, S., Virtanen, J. P., Huttunen, J., RistkariKai, T., Parkkola, K., Gissler, M., Sourander, A. Demographic characteristics and psychiatric comorbidity of children and adolescents diagnosed with ADHD in specialized healthcare. **Child Psychiatry & Human Development**, v. 47, n. 4, p. 574-582, 2016.

Kane, M.J.; Engle, R.W. The role of prefrontal cortex in working-memory capacity, executive attention, and general fluid intelligence: An individual-differences perspective. **Psychonomic Bulletin & Review**, v. 9, n. 4, p. 637-671, 2002.

Kao, H.; Song, H.; Porton, B.; Ming, G.; Hoh, J.; Abraham, M.; Czernik, A.J.; Pieribone, V.A.; Poo, M.M.; Greengard, P. A protein kinase A – dependent

molecular switch in synapsins regulates neurite outgrowth. **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 431–437, 2002.

Kessler, R.C.; Adler L.; Barkley, R.; Biederman, J.; Conners, C.K.; Demler, O.; Faraone, S.V.; Greenhill, L.L.; Howes, M.J.; Secnik, K.; Spencer, T.; Ustun, T.B.; Walters, E.E.; Zaslavsky, A.M. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, p. 716–723, 2006.

Kieling, C.; Genro, J.P.; Hutz, M.H.; Rohde, L.A. The-1021 C/T DBH polymorphism is associated with neuropsychological performance among children and adolescents with ADHD. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 147 n. 4, p. 485-490, 2008.

Koschinski, A.; Zaccolo, M. Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: implications for compartmentalization of cAMP signalling. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–12, 2017.

Krain, A.L.; Castellanos, F.X. Brain development and ADHD. **Clinical Psychology Review**, v. 26, p. 433–444, 2006.

Krstew, E.; Jarrott, B.; Lawrence, A.J. Autoradiographic visualisation of axonal transport of adenosine A1 receptors along the rat vagus nerve and characterisation of adenosine A1 receptor binding in the dorsal vagal complex of hypertensive and normotensive rats. **Brain Research**, v. 802, n. 1-2, p. 61-68, 1998.

Lachance, M.P.; Marlowe, C.; Waddell, W.J. Autoradiographic disposition of [1-methyl-14C]- and [2-14C]caffeine in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 71, p. 237–241, 1983.

Langen, B.; Dost, R. Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animal models: effect of dopamine D1 and alpha2 agonists. **ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2011.

Larson, K.; Russ, S.A.; Kahn, R.S.; Halfon, N. Patterns of Comorbidity, Functioning, and Service Use for US children with ADHD, 2007. **Pediatrics**, v. 127, n. 3, p. 462–470, 2011.

Leffa, D.T.; Panzenhagen, A.C.; Salvi, A.A.; Bau, C.H.; Pires, G.N.; Torres, I.L.; Rohded, L.A. Rovaris, D.L.; Grevet, E.H. Systematic review and meta-analysis of the behavioral effects of methylphenidate in the spontaneously hypertensive rat

model of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 100, p. 166-179, 2019.

Leo, D.; Sorrentino, E.; Volpicelli, F.; Eyman, M.; Greco, D.; Viggiano, D.; di Porzio, U.; Perrone-Capano, C. Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 7, p. 661-669, 2003.

Leon, M.R. Effects of caffeine on cognitive, psychomotor, and affective performance of children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of Attention Disorders**, v. 4, n. 1, p. 27-47, 2000.

Leventer, R.J.; Guerrini, R.; Dobyns, W.B. Malformations of cortical development and epilepsy. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 47- 62, 2008.

Levy, F.; Hay, D.A.; Bennett, K.S.; McStephen, M. Gender differences in ADHD subtype comorbidity, **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 44, p. 368-376, 2005.

Li, H.L.; Zaghloul, N.; Ahmed, I.; Omelchenko, A.; Firestein, B.L.; Huang, H.; Collins, L. Caffeine inhibits hypoxia-induced nuclear accumulation in HIF-1 α and promotes neonatal neuronal survival. **Experimental Neurology**, v. 317, p. 66-77, 2019.

Li, Z.; Chang, S.H.; Zhang, L.Y.; Gao, L.; Wang, J. Molecular genetic studies of ADHD and its candidate genes: a review. **Psychiatry Research**, v. 219, p. 10–24, 2014.

Livingstone, R. L.; Dykman, R.A.; Ackerman, P.T. Psychiatric comorbidity and response to two doses of methylphenidate in children with attention deficit disorder. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 2, n. 2, p. 115-122, 1990.

Mackie, S.; Shaw, P.; Lenroot, R.; Pierson, R.; Greenstein, D.K.; Nugent, T.F.; Sharp, W.S.; Giedd, J.N., Rapoport, J.L. Cerebellar development and clinical outcome in attention deficit hyperactivity disorder. **The American Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 4, 647-655, 2007.

Mahone, E.M.; Ranta, M.E.; Crocetti, D.; O'Brien, J.; Kaufmann, W.E.; Denckla, M.B.; Mostofsky, S.H. Comprehensive examination of frontal regions in boys and

girls with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 17, n. 6, p. 1047-1057, 2011.

Makris, N.; Biederman, J.; Valera, E.M.; Bush, G.; Kaiser, J.; Kennedy, D.N.; Caviness, V.S.; Faraone, S.V.; Seidman, L.J. Cortical thinning of the attention and executive function networks in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Cerebral Cortex**, v. 17, n. 6, p. 1364-1375, 2007.

Marks, V.; Kelly, J.F. Absorption of caffeine from tea, coffee, and coca cola. **The Lancet**, v. 301, p. 827, 1973.

Mayes, R.; Rafalovich, A. Suffer the restless children: the evolution of ADHD and paediatric stimulant use, 1900—80. **History of Psychiatry**, v. 18, n. 4, p. 435-457, 2007.

Mill, T. Sagvolden, P. Asherson. Sequence analysis of Drd2, Drd 4, and Dat1 in SHR and WKY rat strains. **Behavioral and Brain Functions**, v. 1, p. 24, 2005.

Miller, E.M.; Pomerleau, F.; Huettl, P.; Gerhardt, G.A.; Glaser, P.E. Aberrant glutamate signaling in the prefrontal cortex and striatum of the spontaneously hypertensive rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 3019–3029, 2014.

Mioranza, S.; Nunes, F.; Marques, D.M.; Fioreze, G.T.; Rocha, A.S.; Botton, P.H.; Costa, M.S.; Porciúncula, L.O. Prenatal caffeine intake differently affects synaptic proteins during fetal brain development. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 36, p. 45-52, 2014.

Mychailyszyn M.P.; Méndez J.L.; Kendall, P.C. School Functioning in Youth With and Without Anxiety Disorders: Comparisons by Diagnosis and Comorbidity. **Scholl Psychology Review**, v. 39, p.106–121, 2010.

Montes L.G.; Ricardo-Garcel, I J.; De La Torre, L.B.; Alcántara, H.P.; García R.B.; Acosta, D.A.; Bouzas, A.F. Cerebellar gray matter density in females with ADHD combined type: a cross-sectional voxel-based morphometry study. **Journal of Attention Disorders**, v.15, n. 5, p. 368-381, 2011.

Mostofsky, S.H.; Cooper, K.L.; Kates, W.R.; Denckla, M.B.; Kaufmann, W.E. Smaller prefrontal and premotor volumes in boys with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 52, n. 8, p. 785-794, 2002.

Moshe, K; Karni, A; Tirosh, E. Anxiety and methylphenidate in attention deficit hyperactivity disorder: a double-blind placebo-drug trial. **ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders**, v. 4, n. 3, p. 153-158, 2012.

Nakao, T.; Radua, J.; Rubia, K.; Mataix-Cols, D. Gray matter volume abnormalities in ADHD: voxel-based meta-analysis exploring the effects of age and stimulant medication. **American Journal of Psychiatry**, v. 168, p. 1154-1163, 2011.

Nakaso, K., Ito, S., Nakashima, K. Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, v. 432, n. 2, p. 146-150, 2008.

Nøvik, T.S.; Hervas, A.; Ralston, S.J.; Dalsgaard, S.; Pereira, R.R., Lorenzo, M. J; ADORE Study Group*. Influence of gender on attention-deficit/hyperactivity disorder in Europe—ADORE. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 15-24, 2006.

Nobre H.V.Jr.; Cunha, G.M.; de Vasconcelos, L.M.; Magalhães, H.I.; Oliveira Neto, R.N.; Maia, F.D.; de Moraes, M.O.; Leal, L.K.; Viana, G.S. Caffeine and CSC, adenosine A2A antagonists, offer neuroprotection against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochemistry International**, v. 56, n. 1, p. 51–58, 2010.

Nunes, F.; Pochmann, D.; Almeida, A.S.; Marques, D.M.; Porciúncula, L.O. Differential Behavioral and Biochemical Responses to Caffeine in Male and Female Rats from a Validated Model of Attention Deficit and Hyperactivity Disorder. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 11, p. 8486-8498, 2018.

O'Reilly, R.C.; Frank, M.J. Making working memory work: a computational model of learning in the prefrontal cortex and basal ganglia. **Neural Computation**, v. 18(2), p. 283-328, 2006.

Palmer, E.D.; Finger, S. "An Early Description of ADHD (Inattentive Subtype) : Dr Alexander Crichton and 'Mental Restlessness' (1798)." **Child Psychology & Psychiatry Review**, v. 6(2), p. 66–73, 2001.

Pamplona, F.A.; Pandolfo, P.; Savoldi, R.; Prediger, R.D.S.; Takahashi, R.N. Environmental enrichment improves cognitive deficits in spontaneously hypertensive rats (SHR): relevance for attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, p. 1153–1160, 2009.

Pandolfo, P.; Machado, N.J.; Köfalvi, A.; Takahashi, R.N.; Cunha, R.A. Caffeine regulates frontocorticostratial dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 317–328, 2013.

Pan, H.Z.; Chen, H.H. Hyperalgesia, low-anxiety, and impairment of avoidance learning in neonatal caffeine-treated rats. **Psychopharmacology**, v. 191, n1, p. 119-125, 2007.

Pires, V.A.; Pamplona, F.A.; Pandolfo, P.; Fernandes, D.; Prediger, R.D.S.; Takahashi, R.N. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioural Pharmacology**, v. 20(2), p. 134–145, 2009.

Pires, V.A.; Pamplona, F.A.; Pandolfo, P.; Prediger, R.D.S.; Takahashi, R.N. Chronic caffeine treatment during prepubertal period confers long-term cognitive benefits in adult spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Behavioural Brain Research**, v. 215(1), p. 39-44, 2010.

Plessen, K.J.; Bansal, R.; Zhu, H.; Whiteman, R.; Amat, J.; Quackenbush, G. A.; Martin, L.; Durkin, K.; Blair, C.; Royal, J.; Hugdahl, K. Hippocampus and amygdala morphology in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 63(7), p. 795-807, 2006.

Pliszka S.R. Comorbidity of attention-deficit hyperactivity disorder and overanxious disorder. **Journal of the American Academy of Child Adolescent Psychiatry**, v. 31, p. 197–203, 1992.

Pliszka S.R. Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 46, p. 894–892, 2007.

Pliszka S.R. Effect of anxiety on cognition, behavior and stimulant response in ADHD, **Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, v. 28(6), p. 882-887, 1989.

Polanczyk, G.; Laranjeira, R.; Zaleski, M.; Pinsky, I.; Caetano, R.; Rohde, L.A. ADHD in a representative sample of the Brazilian population: estimated prevalence and comparative adequacy of criteria between adolescents and adults according to the item response theory. **International Journal of Methods in Psychiatric Research**, v. 19(3), p. 177-184, 2010.

Polanczyk, G.V.; Salum, G.A.; Sugaya, L.S.; Caye, A.; Rohde, L.A. Annual Research Review: A meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 56(3), p. 345-365, 2015.

Prediger, R.D.S.; Fernandes, D.; Takahashi, R.N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**; v. 159, p. 197–205, 2005.

Prince, J. Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 28, p. 39-45, 2008.

Qiu, A.; Crocetti, D.; Adler, M.; Mahone, E.M.; Denckla, M.B.; Miller, M.I.; Mostofsky, S.H. Basal ganglia volume and shape in children with attention deficit hyperactivity disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 166 (1), p. 74-82, 2009.

Ramos, A.; Berton, O.; Mormède, P.; Chaouloff, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85(1), p. 57-69, 1997.

Ramos, A.; Kangerski, A.L.; Basso, P.F.; Da Silva Santos, J.E.; Assreuy, J.; Vendruscolo, L.F.; Takahashi, R.N. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. **Behavioural Brain Research**, v. 12, p.113-123, 2002.

Ramos, A.; Pereira, E.; Martins, G.C.; Wehrmeister, T.D.; Izídio, G.S. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of

emotional behaviors in one single trial. **Behavioural Brain Research**, v. 193(2), p. 277-288, 2008.

Ramtekkar, U.P.; Reiersen, A.M.; Todorov, A.A.; Todd, R.D. Sex and age differences in attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms and diagnoses: implications for DSM-V and ICD-11. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 49, n. 3, p. 217-228, 2010.

Rebola, N.; Rodrigues, R.J.; Oliveira, C.R.; Cunha, R.A. Different roles of adenosine A1, A2A and A3 receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons. **Neurochemistry International**, v. 47(5), p. 317-325, 2005.

Reiner O.; Sapir, T. Polarity regulation in migrating neurons in the cortex. **Molecular Neurobiology**, v. 40(1), p. 1-14, 2009.

Reja, V.; Goodchild, A.K.; Phillips, J.K.; Pilowsky, P.M. Tyrosine hydroxylase gene expression in ventrolateral medulla oblongata of WKY and SHR: a quantitative real-time polymerase chain reaction study. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 98(1-2), p. 79-84, 2002.

Ribeiro, F.F.; Neves-Tomé, R.; Assaife-Lopes, N.; Santos, T.E.; Silva, R.F.M.; Brites, D.; Ribeiro, J.A.; Sousa, M.M.; Sebastião, A.M. Axonal elongation and dendritic branching is enhanced by adenosine A2A receptors activation in cerebral cortical neurons. **Brain Structure and Function**, v. 221, p. 2777- 2799, 2016.

Ribeiro, J.A.; Sebastiao, A.M.; De Mendonça, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Progress in Neurobiology**, v. 68, n. 6, p. 377-392, 2002.

Ribeiro, F.F, Neves-Tomé, R., Assaife-Lopes, N., Santos, T.E., Silva, J. Diógene, R.F.M., Brites, D., Ribeiro, J.A., Sousa, M.M, Sebastião, A.M. Axonal elongation and dendritic branching is enhanced by adenosine A2A receptors activation in cerebral cortical neurons. **Brain Struct Funct**, v. 221, p. 2777–2799, 2016.

Rocha-Pereira, C.; Arribas, S.M.; Fresco, P.; González, M.C.; Gonçalves, J.; Diniz, C. Impaired inhibitory function of presynaptic A1-adenosine receptors in SHR mesenteric arteries. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 122, p. 59-70, 2013.

Roessner, V.; Sagvolden, T.; Dasbanerjee, T.; Middleton, F.A.; Faraone, S.V., Walaas, S. I.; Becker, A.; Rothenberger, A.; Bock, N. Methylphenidate normalizes

elevated dopamine transporter densities in an animal model of the attention-deficit/hyperactivity disorder combined type, but not to the same extent in one of the attention-deficit/hyperactivity disorder inattentive type. **Neuroscience**, v. 167, n. 4, p. 1183-1191, 2010.

Rogers, P.J.; Heatherley, S.V.; Mullings, E.L.; Wu, Y.; Leonards, U. Caffeine and anxiety. **Appetite**, v. 47(2), p. 274, 2006.

Rogers, P.J.; Heatherley, S.V.; Hayward, R.C.; Seers, H.E.; Hill, J.; Kane, M. Effects of caffeine and caffeine withdrawal on mood and cognitive performance degraded by sleep restriction. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, 742–752, 2005.

Rosa, L.V.; Ardais A.P.; Costa F.V.; Fontana B.D.; Quadros, V.A.; Porciúncula, L.O.; Rosemberg, D.B. Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 165, p. 1-8, 2018.

Rucklidge, J.J. Gender differences in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Psychiatric Clinics**, v. 33, n. 2, p. 357-373, 2010.

Russell, V.A. Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. **Behavioural Brain Research**, v. 130, n. 1-2, p. 191-196, 2002.

Russell, V.A.; Sagvolden, T.; Johansen, E.B. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioral and Brain Functions**, v. 1, p. 1- 9, 2005.

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

Sagvolden, T.; Metzger, M.A.; Schiorbeck, H.K.; Rugland, A.L.; Spinnangr, I.; Sagvolden, G. The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of childhood hyperactivity (ADHD): changed reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants. **Behavioral and Neural Biology**, v. 58, n. 2, p. 103-112, 1992.

Sagvolden, T.; Pettersen, M.B.; Larsen, M.C. Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesis: SHR behavior

compared to four other rat strains, **Physiology & Behavior**, v. 54, p. 1047–1055, 1993.

Sagvolden, T.; Russell, V.A.; Aase, H.; Johansen M E.B.; Farshbaf, M. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1239-1247, 2005.

Sallaberry, C.; Nunes, F.; Costa, M.S.; Fioreze, G.T.; Ardais, A.P.; Botton, P.H.; Klaudat, B, Forte, T.; Souza, D.O.; Elisabetsky. E.; Porciúncula. L.O. Chronic caffeine prevents changes in inhibitory avoidance memory and hippocampal BDNF immunocontent in middle-aged rats. **Neuropharmacology**, v. 64, p.153-159, 2013.

Sakakibara, A.; Hatanaka, Y. Neuronal polarization in the developing cerebral cortex. **Frontier in Neuroscience**, v. 9, p. 1–10, 2015.

Sanchez, S.; Sayas, C.L.; Lim, F.; Avila, J.; Wandosell, F. The inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase induces neurite retraction and activates GSK3. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, p. 468–481, 2001.

Schatz, D.B.; Rostain, A.L. ADHD with comorbid anxiety: a review of the current literature. **Journal of Attention Disorders**, v. 10, n.2, p.141-149, 2006.

Schechter, M.D.; Timmons, G.D. Objectively measured hyperactivity—II. Caffeine and amphetamine effects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 276–280, 1985.

Schnackenberg, R.C. Caffeine as a substitute for Schedule II stimulants in hyperkinetic children. **American Journal of Psychiatry**, v. 130, p. 796– 798, 1973.

Sciberras, E.; Mulraney, M.; Silva, D.; Coghill, D. Prenatal risk factors and the etiology of ADHD—review of existing evidence. **Current Psychiatry Reports**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2017.

Schubert, D.; Martens, G.J.M.; Kolk, S.M. Molecular underpinnings of prefrontal cortex development in rodents provide insights into the etiology of neurodevelopmental disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 7, p. 795- 809, 2015.

Seidman L.J.; Valera E.M.; Makris N. Structural brain imaging of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1263 - 1272, 2005.

Shansky, R.M., Woolley C. S. Considering Sex as a Biological Variable Will Be Valuable for Neuroscience Research. **Journal of Neuroscience**, v. 36, p. 11817-11822, 2016.

Shaw, P.; Lerch, J.; Greenstein, D.; Sharp, W.; Clasen, L.; Evans, A.; Giedd, J.; Castellanos, F.X.; Rapoport, J. Longitudinal mapping of cortical thickness and clinical outcome in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 63(5), p. 540-549, 2006.

Shaw, P.; Malek, M.; Watson, B.; Greenstein, D.; de Rossi, P.; Sharp, W. Trajectories of cerebral cortical development in childhood and adolescence and adult attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 74(8), p. 599-606, 2013.

Shaw, P.; Malek, M.; Watson, B.; Sharp, W.; Evans, A.; Greenstein, D. Development of cortical surface area and gyrification in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 72, p. 191–197, 2012.

Shaw, P.; Eckstrand, K.; Sharp, W.; Blumenthal, J.; Lerch, J.P.; Greenstein, D.; Clasen, L.; Evans, A.; Giedd, J.; Rapoport, J.L. Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19649-19654, 2007.

Shi, S.; Cheng, T.; Jan, L.Y.; Jan, Y. APC and GSK-3 Are Involved in mPar3 Targeting to the Nascent Axon and Establishment of Neuronal Polarity. **Current Biology**, v. 14, p. 2025– 2032, 2004.

Shi, S.; Jan, L.Y.; Jan, Y. Hippocampal Neuronal Polarity Specified by Spatially Localized mPar3 / mPar6 and PI3-Kinase Activity. **Cell**, v. 112 (1), p. 63– 75, 2003.

Shelton, M.A.; Newman, J.T.; Gu, H.; Sampson, A.R.; Fish, K.N.; MacDonald, M.L.; Moyer, C.E.; DiBitetto, J.V.; Dorph-Petersen, K.A.; Penzes, P.; Lewis, D.A.; Sweet, R.A. Loss of Microtubule-Associated Protein 2 Immunoreactivity Linked to Dendritic Spine Loss in Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 78, p. 374-385, 2015.

Sibley, M. H.; Mitchell, J.T.; Becker, S.P. Method of adult diagnosis influences estimated persistence of childhood ADHD: a systematic review of longitudinal studies. **The Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 12, p. 1157-1165, 2016.

Silva, C.G.; Métin, C.; Fazeli, W.; Machado, N.J.; Darmopil, S.; Launay, P.S.; Ghestem, A.; Nesa, M.P.; Bassot, E.; Szabó, E.; Baqi, Y.; Müller, C.E.; Tomé, A.R.; Ivanov, A.; Isbrandt, D.; Zilberter, Y.; Cunha, R.A.; Esclapez, M.; Bernard, C. Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice. **Science Translational Medicine**, v. 5, 197ra104, 2013.

Silva, C.G.; Porciúncula, L.O.; Canas, P.M.; Oliveira, C.R.; Cunha, R.A. Blockade of adenosine A2A receptors prevents staurosporine-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. **Neurobiology of Disease**, v. 27(2), p. 182-189, 2007.

Smith, T.F. Meta-analysis of the heterogeneity in association of DRD4 7-repeat allele and AD/HD: stronger association with AD/HD combined type. **American Journal of Medical Genetics Part B**, v. 153B, p. 1189–1199, 2010.

Snircova, E.; Marcincakova-Husarova, V.; Hrtanek, I.; Kulhan, T.; Ondrejka, I.; Nosalova, G. Anxiety reduction on atomoxetine and methylphenidate medication in children with ADHD. **Pediatrics International**, v. 58(6), p. 476-481, 2016.

Somkuwar, S.S.; Kantak, K.M.; Bardo, M.T.; Dwoskin, L.P. Adolescent methylphenidate treatment differentially alters adult impulsivity and hyperactivity in the Spontaneously Hypertensive Rat model of ADHD. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 141, p. 66-77, 2016.

Song, H.; Pool, M. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 9, p. 355–363, 1999.

Sowell, E.R.; Thompson, P.M.; Bem-vindo, S.E.; Henkenius, A.L.; Toga, A. W.; Peterson, B.S. Cortical abnormalities in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. **Lancet**, 362 (9397),p. 1699-1707, 2003.

Spencer, T. J., Biederman, J., Madras, B. K., Faraone, S. V., Dougherty, D. D., Bonab, A. A., Fischman, A. J. In vivo neuroreceptor imaging in attention-deficit/hyperactivity disorder: a focus on the dopamine transporter. **Biological psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1293-1300, 2005.

Still, G.F. Some abnormal psychical conditions in children: the Goulstonian lectures. **Lancet**, 1:1008–1012, 1902.

Tanaka, H.; Nakazawa, K.; Arima, M.; Iwasaki, S. Caffeine and its dimethylxanthines and fetal cerebral development in rat. **Brain and Development**, v. 6, p. 355–361, 1984.

Tannock, R.; Ickowicz, A.; Schachar, R. Differential effects of methylphenidate on working memory in ADHD children with and without comorbid anxiety. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 34, n. 7, p. 886-896, 1995.

Taylor, E.; Schachar, R.; Thorley, G.; Wieselberg, H.M.; Everit, B.; Rurrer, M. Which boys respond to stimulant medication? A controlled trial of MPH in boys with disruptive behavior. **Psychological Medicine**, v. 17, p. 121-143, 1987

Tchekalarova, J.; Kubova, H.; Mares, P. Postnatal caffeine exposure: effects on motor skills and locomotor activity during ontogenesis. **Behavior Brain Research**, v. 160, p. 99–106, 2005.

Tovo-Rodrigues, L.; Rohde, L.A.; Menezes, A.M.; Polanczyk, G.V.; Kieling, C.; Genro, J.P.; Anselmi, L.; Hutz, M.H. DRD4 rare variants in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): further evidence from a birth cohort study. **PLoS One**, v. 8(12), e85164, 2013.

Tsai, M. L.; Kozłowska, A.; Li, Y.S.; Shen, W.L.; Huang, A.C.W. Social factors affect motor and anxiety behaviors in the animal model of attention-deficit hyperactivity disorders: A housing-style factor. **Psychiatry Research**, v. 254, p. 290-300, 2017.

Tsai, S.J. Attention-deficit hyperactivity disorder and brain-derived neurotrophic factor: a speculative hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 60, p. 849-851, 2003.

Ueno, K.I.; Togashi, H.; Mori, K.; Matsumoto, M.; Ohashi, S.; Hoshino, A.; Fujita, T.; Saito, H.; Minami, M.; Yoshioka, M. Behavioural and pharmacological relevance of stroke-prone spontaneously hypertensive rats as an animal model of a developmental disorder. **Behavioural Pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2002.

Valera, E.M.; Faraone, S.V.; Murray, K.E.; Seidman, L.J. Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 61, p. 1361-1369, 2007.

Van Den Bergh, F.S.; Bloemarts, E.; Chan, J.S.; Groenink, L.; Olivier, B.; Oosting, R.S. Spontaneously hypertensive rats do not predict symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 380–390, 2006.

Vendruscolo L.F.; Izídio, G.S.; Takahashi, R.N.; Ramos, A. Chronic methylphenidate treatment during adolescence increases anxiety-related behaviors and ethanol drinking in adult spontaneously hypertensive rats. **Biological Psychiatry**, v. 19, p. 21-27, 2008.

Villiers, A.D.; Russell, V.A.; Sagvolden, T.; Searson, A.; Jaffer, A.; Taljaard, J.J. F. Alpha2-Adrenoceptor Mediated Inhibition of (3) H) Dopamine Release from Nucleus Accumbens Slices and Monoamine Levels in a Rat Model for Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. **Neurochemical Research**, v. 20(4), p. 427-434, 1995.

Xia, S.; Li, X.; Kimball, A.E.; Kelly, M.S.; Lesser, I.; Branch, C. Thalamic shape and connectivity abnormalities in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Psychiatry Research**, v. 204, p. 161–167, 2012.

Xu, K.; Di Luca, D.G.; Orrú, M.; Xu, Y.; Chen, J-F.; Schwarzschild, M.A. Neuroprotection by caffeine in the MPTP model of parkinson's disease and its dependence on adenosine A2A receptors. **Neuroscience**, v. 322, n. 13, p.129-137, 2016.

Wehmeier P. M., Schacht A., Barkley R. A., Social and Emotional Impairment in Children and Adolescents with ADHD and the Impact on Quality of Life. **Journal of Adolescent Health**, v. 46, p. 209–217, 2010.

Witte, H.; Neukirchen, D.; Bradke, F. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. **Journal of Cell Biology**, v. 180(3), p. 619-632, 2008.

Wultz, B.; Sagvolden, T.; Moser, E.I.; Moser, M.B. The spontaneously hypertensive rat as an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate on exploratory behavior. **Behavioral and Neural Biology**, v. 53, n.1, 88-102, 1990.

Yoshimasu, K., Barbaresi, W.J.; Colligan, R.C.; Voigt, R.G.; Killian, J.M.; Weaver, A.L.; Katusic, S.K. Childhood ADHD is strongly associated with a broad range of psychiatric disorders during adolescence: a population-based birth cohort study. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 53(10), p. 1036–1043, 2012.

Yu, N.Y.; Bieder, A.; Raman, A.; Mileti, E.; Katayama, S.; Einarsdottir, E.; Fredholm, B.B.; Falk, A.; Tapia-Páez, I.; Daub, C.O.; Kere, J. Acute doses of caffeine shift nervous system cell expression profiles toward promotion of neuronal projection growth. **Scientific Reports**, v. 7, p. 11458, 2017.

Zeitlin, R.; Patel, S.; Burgess, S.; Arendash, G.W.; Echeverria, V. Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice. **Brain Research**, v. 1417, p. 127-136, 2001.