

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

Dissertação de Mestrado

CARACTERIZAÇÃO DOS RECEPTORES DE ADENOSINA E DO EFEITO DA
CAFEÍNA SOBRE A MEMÓRIA EM MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA
ESPORÁDICA

JANAÍNA ESPINOSA TEIXEIRA

Orientador

Prof^a Dr^a Lisiane de Oliveira Porciúncula

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Porto Alegre

2011

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Lisiane Porciúncula por ter me acolhido, acreditado no meu trabalho e, principalmente, por ser um exemplo de cientista.

Aos professores Diogo Onofre Gomes de Souza e Luis Valmor Portela pela confiança e oportunidade.

Ao professor Rodrigo Cunha pelas relevantes sugestões em meu trabalho.

A todos os colegas dos laboratórios 26 e 28 pelo apoio e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos colegas de experimento Marcelo Costa, Sabrina Mioranza, Vanessa Kazlauckas, Eduardo “Russo” Kalinine, Vanessa Schein, Paulo Botton, Fernanda Nunes, Gabriela Fioreze, Giordano Viola, Ana Paula Ardais e Cássia Salaberry pela convivência agradável, dedicação, amizade e, principalmente, pelos ensinamentos e pela seriedade.

Aos amigos que fiz no Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Aos funcionários e professores dos Programas de Pós-Graduação em Neurociências e de Pós-Graduação em Bioquímica.

Aos “Guris da Farmaco”, em especial o Thiago Rodrigues Pedroso, pelo companheirismo, pelas muitas horas de cirurgia estereotáxica, sitcom e neurofisiologia.

A todos meus amigos que sempre me auxiliaram em todos os aspectos.

A minha mãe, a quem devo minha vida.

“Science is a way of thinking much more than it is a body of knowledge.”

Carl Sagan

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS RELACIONADOS À ADENOSINA.....	11
1.2. METABOLISMO DA ADENOSINA	12
1.3. ADENOSINA E MEMÓRIA	15
1.4. ADENOSINA E NEUROPROTEÇÃO	16
1.5. DOENÇA DE ALZHEIMER.....	18
1.6. FENÓTIPO NEUROPATOLÓGICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	19
1.7. ADENOSINA E DOENÇA DE ALZHEIMER	21
1.8. SINALIZAÇÃO INSULÍNICA E DOENÇA DE ALZHEIMER.....	22
1.9. MODELO DE DEMÊNCIA INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA.....	25
1.10. CAFEÍNA	27
1.11. METABOLISMO DA CAFEINA.....	28
1.12. MECANISMO DE AÇÃO DA CAFEÍNA NO SNC	29
1.13. CAFEÍNA E DESEMPENHO COGNITIVO	30
ENVELHECIMENTO	31
1.14. CAFEÍNA E DOENÇA DE ALZHEIMER	31
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1. ANIMAIS	37
3.2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	37
3.3. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	38
Campo Aberto	38
Tarefa do Reconhecimento do Objeto Novo	38
3.6. TRATAMENTO COM CAFEÍNA	42

3.7. Análise Estatística.....	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Manuscrito em preparação: Adenosine A_{2A} receptors immuncontent is increased in the hippocampus from a rat model of sporadic dementia.....	45
4.2. EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE A MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO.....	70
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

5'NT	5'nucleotidase
A₁	Receptor de adenosina subtipo A ₁
A_{2A}	Receptor de adenosina subtipo A _{2A}
Aβ	Peptídeo β -amilóide
ADO	Adenosina
ADK	Adenosina quinase
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5 metil- 4 isoxazol propionato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora do amiloide
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
DA	Doença de Alzheimer
DM	Diabetes melito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ENT	Transportador equilibrativo de nucleosídeo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GSK-3β	Glicogênio sintase quinase-3 β
i.c.v.	Intracerebroventricular
LTP	Potenciação de longa duração
MAPT	Proteína tau associada ao microtúbulo

mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAD⁺	Dinucleotídeo de adenina nicotinamida
NADP⁺	Dinucleotídeo de adenina nicotinamida fosfato
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosil-metionina
SNC	Sistema nervoso central
STZ	Estreptozotocina

RESUMO

A adenosina é um neuromodulador que exerce seus efeitos por meio dos abundantes receptores inibitórios A_1 e dos menos abundantes – mas de localização mais difundida – receptores facilitatórios A_{2A} . O sistema adenosinérgico parece ser o principal alvo molecular da cafeína. Evidências recentes indicam que tanto a cafeína quanto antagonistas dos receptores A_{2A} efetivamente revertem o comprometimento da memória em condições como o envelhecimento e a demência de Alzheimer, tanto em humanos quanto em modelos experimentais. A administração icv de STZ interrompe a sinalização encefálica da insulina e produz tanto comprometimento da memória quanto modificações patológicas semelhantes às daquelas da demência de Alzheimer, sendo considerado um modelo animal de demência esporádica. Dessa forma, o principal objetivo do presente estudo foi investigar o impacto da demência induzida por STZ sobre a densidade e a expressão dos receptores de adenosina no hipocampo e se o consumo de cafeína poderia prevenir a deterioração da memória nesse modelo. Os resultados mostram que a STZ produziu comprometimento da memória de reconhecimento acompanhado de aumento do imunoconteúdo dos receptores A_{2A} . Além disso, foi observado que o consumo de cafeína conferiu robusta proteção contra o prejuízo de memória induzido por STZ icv. Portanto, este estudo confirma o comprometimento de memória nesse modelo e o associa agora à modificação do imunoconteúdo de receptores A_{2A} . Essas observações fornecem suporte adicional para a possibilidade de que o consumo de cafeína poderia ser uma estratégia para prevenir o déficit menemônico.

ABSTRACT

Adenosine is a neuromodulator that operates via the most abundant inhibitory adenosine A₁ receptors and the less abundant, but widespread, facilitatory A_{2A} receptors. The adenosine system seems to be the main molecular target of caffeine. Recent evidences indicate that both caffeine and selective A_{2A} antagonists effectively counteract memory impairment in conditions such as aging and Alzheimer's disease, both in humans and in experimental models. Intracerebroventricular streptozotocin administration disrupts brain insulin signaling and induces both memory impairment and pathological modifications resembling Alzheimer's disease, being considered an experimental model of sporadic dementia. In this way, the main aim of the present study was to investigate the impact of STZ-induced dementia on density and expression of hippocampal adenosine receptors and whether caffeine consumption might prevent memory deterioration in this model. The results show that STZ produced memory recognition impairment accompanied by an increased immunocontent of adenosine A_{2A} receptors. Besides, it was observed that caffeine intake afforded robust protection against icv STZ-induced memory disturbance. Finally, this study confirms the memory impairment of this model, now associated with modification in the adenosine immunocontent. It gives additional support for the possibility that caffeine consumption might be a prophylactic strategy to manage memory dysfunction.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS RELACIONADOS À ADENOSINA

A adenosina é uma purina nucleosídeo presente no meio extracelular e em virtualmente todas as células, estando diretamente envolvida na síntese de ácidos nucleicos, no metabolismo de aminoácidos e em sistemas que regulam o funcionamento celular (Stone, 1985).

A primeira evidência sugerindo que a adenosina poderia exercer funções fisiológicas surgiu a partir de um estudo realizado por Drury e Szent-Gyorgyi, no qual a injeção de adenosina em mamíferos produziu hipotensão, vasodilatação e bradicardia (Drury e Szent-Gyorgyi, 1929). Em meados da década de 1960, a hipótese de que a adenosina seria um regulador do fluxo sanguíneo recebeu suporte adicional com a demonstração de que a adenosina liberada pelo músculo cardíaco hipóxico e isquêmico atuava como um sinalizador de demanda energética, aumentando o fluxo sanguíneo e restabelecendo o aporte de oxigênio necessário para a manutenção das funções fisiológicas (Berne e Rubio, 1974). A partir dessa observação, a adenosina recebeu a denominação de “modulador homeostático”, atuando como um agente regulador autócrino protetor (Williams, 1989). Estudos sobre os efeitos da adenosina sobre a neurotransmissão demonstraram que a estimulação elétrica foi capaz de promover a sua liberação em fatias encefálicas (Pull and McIlwain, 1972) e que a adição de adenosina exógena reduziu a liberação de acetilcolina (ACh) pela junção neuromuscular (Ginsborg and Hirst, 1972). Posteriormente, verificou-se que a adenosine também foi capaz de reduzir a liberação de outros neurotransmissores, como dopamina, serotonina e noradrenalina (Harms et al., 1978; Fredholm e Hedqvist, 1980).

1.2. METABOLISMO DA ADENOSINA

A molécula de adenosina possui, *per se*, função sinalizadora e, além disso, é parte de moléculas chaves na determinação da homeostasia celular. Dessa forma, a adenosina desempenha importante papel no controle do ciclo celular por SAH e SAM, na definição do estado redox por NAD^+ e NADP^+ e na determinação do balanço energético celular por AMP, ADP e ATP (Cunha, 2001). A adenosina intracelular é formada a partir da ação da 5'NT sobre o AMP (Schubert et al., 1979) ou por meio da hidrólise de SAH (Broch e Ueland, 1980). Em contrapartida, no SNC a adenosina possui três principais fontes extracelulares: liberação por meio dos transportadores equilibrativos de nucleosídeos (ENT1 e ENT2) presentes nas membranas celulares após aumento do nível intracelular de adenosina; conversão dos nucleotídeos de adenina em adenosina pelas ectonucleotidases e a partir do AMPc liberado no meio extracelular (Dunwiddie e Masino, 2001; Latini e Pedata, 2001).

Além do papel fundamental no controle do metabolismo celular, a adenosina também desempenha funções restritas ao SNC. A adenosina é classificada como neuromodulador por não preencher os critérios para ser classificado como neurotransmissor clássico (i.e. ser sintetizado em sinapses específicas e armazenado em vesículas, ser liberado por meio da despolarização da membrana neuronal, promover despolarização ou hiperpolarização de neurônios pós-sinápticos, possuir mecanismo específico de inativação e ter sua ação mimetizada pela administração de um análogo exógeno) (Cunha, 2001). O conceito de neuromodulação diz respeito a substâncias endógenas que influenciam a liberação (modulação pré-sináptica)

ou a ação de um neurotransmissor (modulação pós-sináptica) (Ribeiro e Sebastião, 2010).

Até o presente momento, foram clonados quatro subtipos de receptores de adenosina em humanos e roedores – A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Todos os subtipos de receptores de adenosina são acoplados à proteína G e podem atuar de maneira inibitória (via receptores A_1 e A_3) ou facilitatória (via receptores A_{2A} e A_{2B}) (Linden, 2001), sendo a neuromodulação pela adenosina mediada principalmente pela ativação dos receptores de alta afinidade A_1 e A_{2A} .

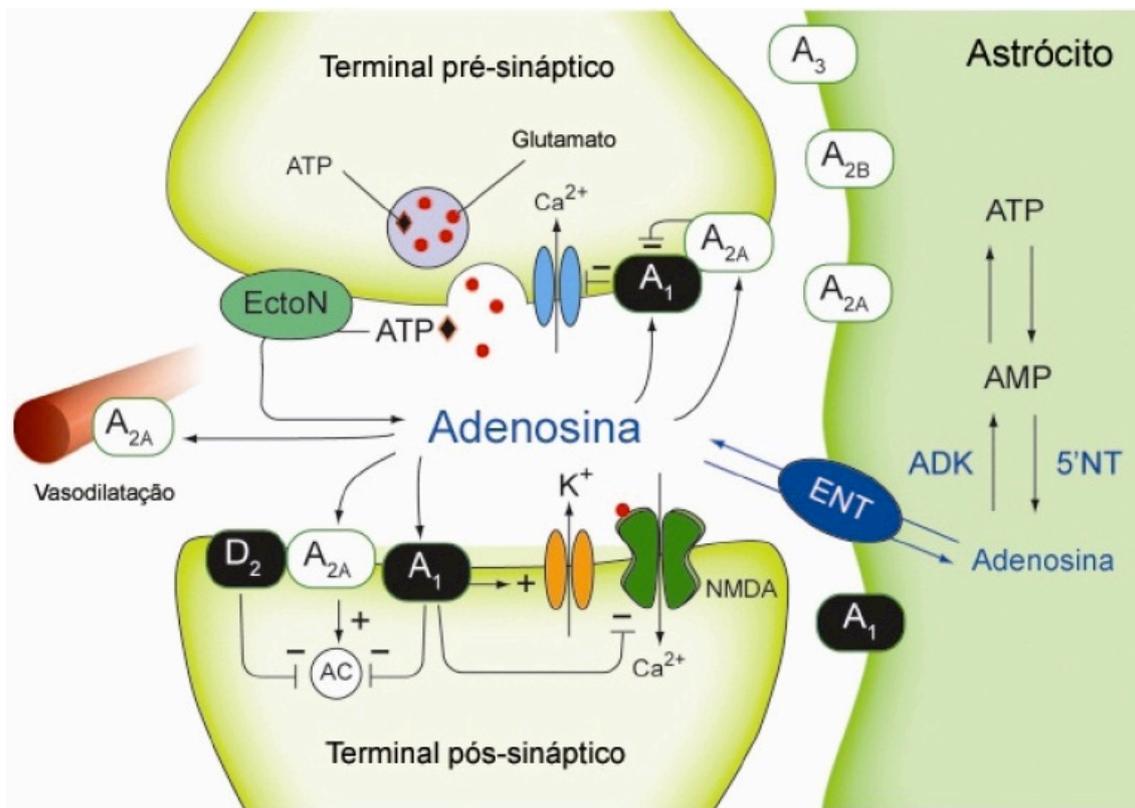


Figura 1. Principais características da sinalização adenosinérgica no SNC representadas em uma versão simplificada de uma sinapse. As duas principais fontes de adenosina extracelular são o transporte via transportador equilibrativo de nucleosídeo (ENT) e a conversão extracelular da adenosina trifosfato (ATP) pela ação das ectonucleotidases (EctoN). Os receptores A_1 e A_{2A} são os principais mediadores dos efeitos encefálicos da adenosina. Os

receptores A_1 inibem a adenilato ciclase (AC), aumentam a condutância aos íons potássio (K^+) e inibem os canais de cálcio (Ca^{2+}) pré-sinápticos. Esses receptores inibem a liberação de glutamato e as respostas pré-sinápticas mediadas pelos receptores N-metil-D aspartato (NMDA). Os receptores A_{2A} estimulam a AC e podem formar complexos de receptores heteroméricos com os receptores A_1 ou com os receptores de dopamina D_2 e antagonizar os efeitos da dopamina em neurônios estriado-palidais. Os receptores A_{2A} pré-sinápticos antagonizam os efeitos inibitórios dos receptores A_1 sobre a liberação de glutamato. Os receptores A_{2A} também estão presentes nos vasos sanguíneos e medeiam o efeito vasodilatador da adenosina no encéfalo e na periferia. ADK = adenosina cinase; AMP = adenosina monofosfato; 5'NT = 5'nucleotidase (adaptado de Benarroch, 2008).

O receptor A_1 é amplamente expresso no córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e no corno dorsal da medula espinhal. Os receptores A_1 exercem efeito inibitório sobre a liberação de virtualmente quase todos neurotransmissores clássicos: glutamato, GABA, acetilcolina, noradrenalina, serotonina e dopamina (Dunwiddie e Hoffer 1980). Os mecanismos de modulação inibitória dos receptores A_1 sobre a transmissão sináptica e a excitabilidade neuronal envolvem ações pré e pós-sinápticas. A ativação de receptores A_1 pré-sinápticos localizados em terminais nervosos excitatórios bloqueia o influxo de íons cálcio, resultando na inibição da liberação do neurotransmissor. Além disso, receptores A_1 pós-sinápticos reforçam a eficiência desse sistema inibitório. Quando ativados, receptores A_1 pós-sinápticos promovem aumento da condutância da membrana neuronal aos íons potássio, o que leva a diminuição da taxa de disparo neuronal e contribui para a inibição da transmissão sináptica (Brambilla et al., 2005; Greene e Haas, 1991).

Os receptores do subtipo A_{2A} são abundantemente expressos em neurônios GABAérgicos da via estriado-palidal e em menor quantidade em outras regiões encefálicas, como o hipocampo (Ribeiro et al., 2002). Por estarem acoplados à proteína G estimulatória, a ativação dos receptores A_{2A} leva a ativação de canais de íons cálcio, facilitando a liberação de neurotransmissores (Benarroch, 2008).

1.3. ADENOSINA E MEMÓRIA

A base neurofisiológica da formação de uma memória é a habilidade dos circuitos neuronais modificarem a eficiência da neurotransmissão após uma experiência de aprendizado. Determinadas frequências de disparo glutamatérgicas promovem um aumento da eficiência dessas sinapses que pode persistir por um longo período – fenômeno denominado potenciação de longa duração (*“Long-term Potentiation”* ou “LTP”). A indução da LTP é dependente da ativação dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA e é um fenômeno considerado substrato para a consolidação da memória (Lynch, 2004).

Muitas evidências indicam um papel modulatório da adenosina e seus receptores sobre a memória e o aprendizado de roedores (Corodimas e Tomita, 2001; Kopf et al., 1999). Estudos prévios indicam que a ativação dos receptores A₁ exerce efeitos inibitórios sobre a resposta mediada pelos receptores NMDA no hipocampo, limitando a indução da LTP (de Mendonca e Ribeiro, 1994; de Mendonca et al., 1995). De fato, a administração de um

agonista A_1 antes do teste da esQUIVA passiva comprometeu a memória, enquanto antagonistas seletivos melhoram o desempenho cognitivo em roedores (Maemoto et al., 2004; Normile e Barraco, 1991).

Além disso, o envolvimento dos receptores A_{2A} em processos cognitivos também já foi descrito (Cunha et al., 2008; Schiffmann et al., 2007). Estudos utilizando ratos transgênicos com aumentada expressão de receptores A_{2A} apresentaram pior desempenho em testes de memória e aprendizado quando comparados aos animais sem alteração na expressão de A_{2A} (Gimenez-Llort et al., 2007). De acordo com essa observação, a administração de antagonistas seletivos A_{2A} melhorou o desempenho de roedores em tarefas envolvendo memória de reconhecimento (Prediger et al., 2005), bem como a inativação genética dos receptores A_{2A} aumentou a memória de reconhecimento espacial de camundongos (Wang et al., 2006).

1.4. ADENOSINA E NEUROPROTEÇÃO

A adenosina parece desempenhar um papel fundamental na resposta à neurodegeneração visto que em condições fisiológicas, suas concentrações são baixas no fluido extracelular, mas em situações de injúria celular tais como isquemia, hipóxia, inflamação os níveis de adenosina aumentam drasticamente (Cunha, 2001; Latini e Pedata, 2001). O mecanismo responsável por esse aumento da concentração extracelular de adenosina ainda não está claro. Tem sido proposto que a formação da adenosina extracelular resulta do catabolismo de nucleotídeos de adenina liberados por estímulos estressores. Alguns

estudos relataram que tanto a despolarização axonal quanto o aumento da atividade glutamatérgica – marcadores de potenciais condições neurotóxicas – são efetivos liberadores de ATP (Brown e Dale, 2002; Liu e Bennett, 2003). Além disso, foi encontrado aumento da atividade das ectonucleotidases em resposta a estímulos nocivos (Bonan et al., 2000; Fontella et al., 2004). Todavia, o efeito do aumento da concentração extracelular de adenosina, sob condições de injúria, é neuroprotetor (Cunha, 2001; Fredholm et al., 2003; Ongini et al., 1997; Pedata et al., 2001; Schwarzschild et al., 2002). Diversos estudos utilizando diferentes estímulos nocivos verificaram que a adenosina liberada nessas situações causa ativação aguda dos receptores A_1 , reduzindo o dano neuronal, enquanto antagonistas dos receptores A_1 potencializam a lesão (de Mendonca et al., 2000; Fredholm, 1997; Sweeney, 1997; Von Lubitz et al., 1999). No entanto, atuando via receptores do subtipo A_{2A} , a adenosina também pode provocar morte celular (de Mendonca et al., 2000). Estímulos nocivos crônicos causam aumento da expressão e densidade dos receptores do A_{2A} , conforme demonstrado em modelos animais de epilepsia, estresse, diabetes e da doença de Parkinson (Cunha et al., 2006; Duarte et al., 2006; Pinna et al., 2002; Rebola et al., 2005; Tomiyama et al., 2004) e o bloqueio desses receptores confere robusta neuroproteção em condições patológicas (Behan e Stone, 2002; Chen et al., 1999; Gao e Phillis, 1994; Gui et al., 2009; Monopoli et al., 1998; Von Lubitz et al., 1995). Até o presente momento, não há consenso entre o mecanismo pelo o qual o bloqueio dos receptores A_{2A} confere neuroproteção em condições nocivas, mas duas hipóteses têm sido exploradas para explicar esse fenômeno: (1) controle da excitotoxicidade glutamatérgica, uma vez que ativação dos receptores A_{2A} tem efeito facilitatório sobre a

ativação dos receptores NMDA e a ativação excessiva desses receptores desempenha papel crucial na iniciação de eventos excitotóxicos (Lipton e Rosenberg, 1994; Popoli et al., 2003) e (2) controle do processo neuroinflamatório ao prevenir a ativação das células microgliais (Lee et al., 2004; Schubert e Rudolphi, 1998).

1.5. DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer é uma síndrome neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva da memória, compreensão, capacidade de aprendizado e julgamento, levando a incapacitação para as atividades cotidianas (Neugroschl e Sano, 2009). Compreendendo de 70% a 90% dos casos, a Doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência (Ritchie e Lovestone, 2002).

A Doença de Alzheimer pode ser classificada como de origem familiar ou esporádica. A familiar é de início precoce – entre 30 e 60 anos – e está associada a mutações nos genes que codificam a Proteína Precursora do Beta Amilóide (APP), Presenilina 1 (PSEN1), Presenilina 2 (PSEN2) e a Proteína Tau Associada ao Microtúbulo (MAPT). Em contrapartida, a Doença de Alzheimer esporádica é de início tardio – aos 60 anos, a prevalência é de 0,5%, chegando a 50% na faixa etária de 85 anos – e não está relacionada às mutações observadas na Doença de Alzheimer do tipo familiar (Ott et al., 1996). A descoberta de que o alelo 4 ApoE aumenta o risco de desenvolvimento da Doença de Alzheimer esporádica forneceu maiores indícios sobre a

fisiopatologia da Doença de Alzheimer de início tardio (Strittmatter et al., 1993). Estudos de análise genética demonstraram que o alelo 4 da ApoE é altamente expresso em indivíduos com Doença de Alzheimer do tipo esporádica (Corder et al., 1996). No entanto, há evidências indicando que aumentada expressão do alelo 2 da ApoE é um fator protetor para a Doença de Alzheimer (Tiraboschi et al., 2004).

1.6. FENÓTIPO NEUROPATOLÓGICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Em necropsias do encéfalo de indivíduos portadores da Doença de Alzheimer foi possível observar alterações difusas, incluindo atrofia, redução na espessura dos giros e alargamento dos sulcos corticais. Estima-se que a redução do volume de massa encefálica nesses indivíduos seja de até um terço, com perda mais acentuada em regiões do neocórtex (Geula e Mesulam, 1989). Histologicamente, os principais marcadores da Doença de Alzheimer são as placas senis, os aglomerados neurofibrilares e a perda neuronal em regiões seletivas do encéfalo (Selkoe, 2001). Embora a etiologia da Doença de Alzheimer ainda não esteja bem descrita, o acúmulo de determinadas formas do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) ainda parecer ser o principal componente causal dessa patologia (Hardy e Selkoe, 2002; Price et al., 1998). O peptídeo β -amilóide se agrega rapidamente, forma lâminas β -pregueadas, é relativamente resistente à degradação, desencadeia resposta dos astrócitos e da microglia e pode ser diretamente neurotóxico (Chimon et al., 2007; Perez et al., 2010; Selkoe, 2008). Este peptídeo é formado a partir da clivagem da APP, uma proteína transmembrana cujas funções ainda estão sendo investigadas. Uma

série de papéis fisiológicos tem sido propostos para essa proteína sendo um deles e, talvez o mais consistente o de fator trófico, pois APP é capaz de estimular o crescimento de neuritos e outras linhagens celulares (Saitoh et al., 1989; Hung et al., 1992). Outra função atribuída a APP diz respeito à adesão celular, já que essa proteína está localizada junto às integrinas em sítios de adesão celular (Storey et al., 1996; Yamazaki et al., 1997). Estudos demonstrando a interação entre APP, laminina e colágeno fornecem evidências adicionais sobre seu papel na adesão celular (Thinakaran e Koo, 2008). Mais de 25 diferentes mutações no gene que codifica a APP já são conhecidas e se relacionam com a Doença de Alzheimer de origem familiar. O domínio extracelular da APP sofre clivagem pelas secretases do tipo α ou β , enquanto a porção transmembrana remanescente é clivada pela secretase do tipo γ (Hardy e Selkoe, 2002; Thinakaran e Koo, 2008). Embora a clivagem pela α -secretase libere produtos solúveis e classificados como não tóxicos ou neurotróficos, a clivagem pela β -secretase inicia um processamento patogênico e amiloidogênico da APP. Após a ação da β -secretase, o fragmento remanescente no interior do domínio transmembrana sofre ação da γ -secretase. A clivagem pela γ -secretase gera, nessa cascata, peptídeos cujo comprimento varia entre 38 a 43 resíduos de aminoácidos, sendo o peptídeo de 42 resíduos (A β 42) o associado à Doença de Alzheimer.

Outros achados neuropatológicos da Doença de Alzheimer incluem os emaranhados neurofibrilares e a deterioração de neurônios colinérgicos (Walsh e Selkoe, 2004). Estudos têm revelado que o acúmulo do A β inicia uma cascata de eventos neurotóxicos que incluem falha sináptica e hiperfosforilação

MAPT, resultando em disfunção e morte neuronal (Selkoe, 2001; Hardy e Selkoe, 2002).

1.7. ADENOSINA E DOENÇA DE ALZHEIMER

É comumente aceito que os receptores do subtipo A_1 possuem papel chave nos mecanismos de neuroproteção, uma vez que esses reduzem a liberação de glutamato e hiperpolarizam os neurônios (Cunha, 2001). A ativação aguda dos receptores A_1 proporciona neuroproteção sob diferentes condições de injúria neuronal, enquanto o seu bloqueio potencializa a lesão (Fredholm, 1997; de Mendonça et al., 2000). Imunodeteção dos receptores de adenosina no hipocampo e no córtex cerebral de indivíduos que eram portadores da Doença de Alzheimer revelou alterações no padrão de expressão e, também, uma redistribuição dos receptores de adenosina, comparados aos encéfalos de indivíduos controles. Imunoreatividade para receptores de adenosina A_1 foi encontrada em neurônios em degeneração com filamentos neurofibrilares e nos neuritos distróficos das placas senis (Angulo et al., 2003), sendo possível que esse aumento seja um mecanismo compensatório agudo de neuroproteção no contexto da Doença de Alzheimer. A análise *post-mortem* do córtex cerebral de pacientes portadores da Doença de Alzheimer também revelou um aumento da densidade dos receptores A_1 e A_{2A} em comparação com indivíduos da mesma idade que não eram portadores (Albasanz et al., 2008). Em camundongos transgênicos (Tg2576) portadores da mutação no gene codificador da APP, considerados um modelo animal de Doença de Alzheimer, foram encontrados níveis significativamente elevados de

receptores A_1 no córtex cerebral e de receptores A_{2A} no hipocampo (Arendash et al., 2006).

Os receptores A_{2A} , ao contrário do subtipo inibitório A_1 , estão envolvidos nos processos de neurodegeneração (Rebola et al., 2005) e evidências de estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o bloqueio dos receptores A_{2A} pode atenuar o dano neuronal causado pelo $A\beta$ (Canas et al., 2009a; Dall'Igna et al., 2003). A administração de um antagonista dos receptores A_{2A} preveniu o déficit de memória e aprendizado nas tarefas de esquiiva inibitória, labirinto em Y e a perda sináptica em um modelo de Doença de Alzheimer induzida pela administração intrarecebroventricular de $A\beta$ em roedores (Cunha et al., 2006; Dall'Igna et al., 2007).

1.8. SINALIZAÇÃO INSULÍNICA E DOENÇA DE ALZHEIMER

Há pelo menos três décadas, acreditava-se que o encéfalo era um órgão totalmente insensível à insulina. A primeira evidência contra essa hipótese surgiu com a detecção de insulina imunorreativa no fluido cerebrospinal de cães (Margolis e Altszuler, 1967), sugerindo que a insulina periférica poderia atravessar a barreira hematoencefálica. Atualmente, estudos indicam que a insulina encontrada no encéfalo é majoritariamente sintetizada nas células β -pancreáticas, com um menor percentual sendo produzido por neurônios piramidais do hipocampo, córtex pré-frontal, córtex entorrinal e bulbo olfatório (Santos et al., 1999). Os receptores de insulina também estão presentes no encéfalo de humanos e de roedores, com altas concentrações detectadas no

bulbo olfatório, hipotálamo, hipófise, hipocampo e córtex (Unger et al., 1991; Schulingkamp et al., 2000). O papel da insulina no SNC tem sido pouco documentado quando comparado com suas funções no músculo esquelético e tecido adiposo. Entretanto, sabe-se que a insulina e os receptores de insulina possuem funções no SNC que não estão necessariamente associadas ao metabolismo da glicose, como a excitabilidade neural e a plasticidade sináptica (Skeberdis et al. 2001). Foi demonstrado que a insulina rapidamente recruta receptores GABA_A nos terminais pós-sinápticos de neurônios hipocampais, incrementando a sinalização por esse sistema (Wan et al., 1997). A insulina também pode promover a internalização dos receptores AMPA, promovendo o fenômeno da depressão de longa duração (*“Long-term Depression”* ou LTD) de sinapses excitatórias do hipocampo e cerebelo (Man et al., 2000). A LTD é uma persistente redução da eficácia sináptica que, juntamente com o fenômeno da LTP, tem sido considerada crucial para o aprendizado e a memória (Siegelbaum e Kandel, 1991).

Embora a neuropatologia da Doença de Alzheimer seja primariamente caracterizada pelo acúmulo de placas extracelulares de A β e emaranhados neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada, sabe-se que essa patologia não é uma entidade única. Muitas evidências sugerem que um comprometimento no metabolismo encefálico da glicose é um evento precoce e progressivo da Doença de Alzheimer. Estudos de imagem utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET) revelaram acentuado decréscimo no metabolismo da glicose em regiões do neocórtex de indivíduos portadores da Doença de Alzheimer – particularmente córtex frontal e temporal (Herholz et al., 2002). Além disso, estudos populacionais indicam que o diabetes mellitus é um fator

de risco para demência e, também, que há uma relação entre resistência insulínica, diabetes mellitus e Doença de Alzheimer (Ott et al., 1996; Kuusisto et al., 1997; Leibson et al., 1997). Outros estudos clínicos fornecem evidências bastante persuasivas sobre a importância da sinalização insulínica no contexto da Doença de Alzheimer. Altas concentrações plasmáticas de insulina no jejum e reduzidas concentrações de insulina no líquido cerebrospinal – indicadores de resistência à insulina – têm sido detectadas em pacientes com Doença de Alzheimer (Craft et al., 1993; Frolich et al., 1998). Também foi observado que o aumento nos níveis plasmáticos de insulina após indução de hiperglicemia ocasionou aumento do desempenho cognitivo em pacientes com Doença de Alzheimer de grau moderado. De maneira inversa, a indução de hiperglicemia em pacientes com Doença de Alzheimer severa não aumentou os níveis plasmáticos de insulina e, conseqüentemente, também não melhorou o desempenho cognitivo desses indivíduos (Craft et al., 1999). Em um seguimento de 18 meses com pacientes portadores de Doença de Alzheimer de grau moderado, naqueles cuja demência progrediu houve redução nas concentrações plasmáticas de insulina após hiperglicemia e redução nos processos de facilitação da memória (Craft et al., 1993). Portanto, dados biológicos suportam a hipótese de que a insulina é um componente importante na regulação das funções cognitivas e indicam mecanismos celulares e moleculares que determinam essa associação.

1.9. MODELO DE DEMÊNCIA INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA

A STZ é uma nitrosuréia derivada do fungo *Streptomyces griseus* e seletivamente tóxica às células produtoras de insulina. Quando administrada via intraperitoneal (50-100 mg/kg), a STZ é captada pelas células β -pancreáticas via GLUT2 e promove o comprometimento da síntese de insulina, sendo considerado um modelo de diabetes mellitus em roedores (Schnedl et al., 1994). Nesse modelo, o principal mecanismo de ação intracelular proposto para a STZ é a alquilação do ADN, com conseqüente fragmentação cromossomal e morte celular (Delaney et al. 1995). Outros mecanismos pelos quais a STZ exerce seus efeitos deletérios sobre as células β -pancreáticas também foram descritos. A STZ é um potencial doador de NO e experimentos confirmam a participação dessa molécula na citotoxicidade induzida por STZ (Turk et al. 1993, Kröncke et al. 1995). Além disso, a STZ também leva a formação de espécies reativas de oxigênio, o que contribui para a fragmentação do ADN e o comprometimento celular (Bedoya et al. 1996).

As evidências sobre a interação entre metabolismo da glicose e cognição levaram Meyer e colaboradores a testar o efeito da administração i.c.v de STZ sobre as funções cognitivas de ratos (Mayer et al., 1990). A administração i.c.v. de STZ, em doses até 100 vezes menores que a utilizada para induzir experimentalmente diabetes mellitus, reduziu a utilização da glicose em 17 de 35 áreas encefálicas (Duelli et al.,1994) e a atividade das enzimas glicolíticas em córtex e hipocampo. Também foi observado aumento dos níveis corticais de glicogênio, sem alteração sistêmica no metabolismo da glicose, uma vez que a STZ não atravessa a barreira hematoencefálica (Nitsch

e Hoyer 1991; Plaschke e Hoyer, 1993; Duelli et al. 1994; Lannert e Hoyer 1998). O comprometimento do aprendizado e memória produzido por STZ i.c.v. é progressivo e de longo prazo. Duas semanas após a injeção i.c.v de STZ, a retenção da memória em esQUIVA inibitória foi reduzida, mas não foi observado efeito significativo sobre a memória espacial avaliada no labirinto aquático de Morris (Mayer et al., 1990). No entanto, em maior dose, a STZ promoveu comprometimento da memória espacial (Agrawal et al., 2010) e da memória de reconhecimento (Shoham et al., 2007).

Estudos neuroquímicos e histológicos correlacionam as alterações comportamentais induzidas pela administração i.c.v. de STZ e os marcadores histopatológicos da DA. Foi demonstrado que o aumento do imunocontéudo cortical de MAPT hiperfosforilada e do A β são conseqüências de longo prazo da injeção i.c.v. de STZ, assim como o acúmulo de placas senis (Lester-Coll et al. 2006) e significativa redução da atividade da colina acetiltransferase no hipocampo (Ishrat et al., 2006; Prickaerts et al., 1999). Além disso, análise por Western blot revelou aumento do imunocontéudo da forma fosforilada da GSK-3 β no encéfalo de ratos após infusão i.c.v. de STZ (Salkovic-Petrisic et al., 2006). A GSK-3 β é ativa na forma fosforilada e tem papel chave na hiperfosforilação da MAPT e no processamento amiloidogênico da APP (Ferrer et al., 2002; Phiel et al., 2003).

1.10. CAFEÍNA

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcalóide pertencente ao grupo das xantinas e o psicoestimulante mais consumido no mundo.

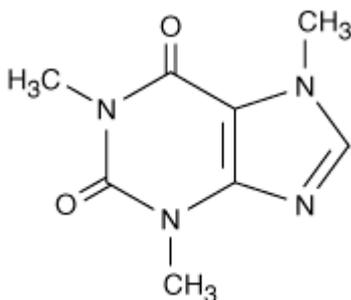


Figura 2. Fórmula estrutural da cafeína (Katzung, 2004).

A maior parte da cafeína consumida é proveniente de fontes alimentares como café, chá e chocolate. O conteúdo de cafeína presente nesses alimentos varia de 40 a 180 mg/150 ml para o café, de 24 a 50 mg/150 ml para o chá e de 1 a 36 mg/28 g para o chocolate. O consumo diário mundial de cafeína é estimado entre 70 a 76 mg por pessoa, mas pode atingir cerca 210 a 238 mg nos Estados Unidos e Canadá e mais de 400 mg na Suécia e Finlândia. As consideráveis diferenças observadas na estimativa de consumo de alguns países podem, em parte, ser explicadas pela dificuldade em considerar todas as fontes de cafeína (Fredholm et al., 1999).

Há alguns anos foi proposto que a cafeína poderia ser uma droga de abuso em potencial (Gilliland e Bullock, 1983). No entanto, por serem mínimas as consequências negativas do consumo agudo e especialmente crônico de cafeína, as agências governamentais reguladoras não impuseram nenhuma

restrição ao consumo dessa substância. Além disso, poucos usuários de cafeína relatam perda de controle sobre o seu consumo (Dews et al., 1999).

1.11. METABOLISMO DA CAFEINA

A cafeína é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal em humanos, chegando a 99% em 45 minutos após a ingestão. O pico de concentração plasmática da cafeína ocorre entre 15 e 120 minutos após administração oral em humanos (Arnaud e Welsch, 1982; Bonati et al., 1982). Essa ampla variação de tempo é atribuída a diferenças individuais na velocidade de esvaziamento gástrico e à presença ou não de outros componentes na dieta capazes de retardar a absorção da cafeína (Arnaud, 1987). Após absorção, a cafeína sofre metabolismo de primeira passagem pouco significativo, conforme indicado pela similaridade entre as curvas de concentração plasmática após administração oral e endovenosa em humanos e ratos (Devoe et al., 1993). A propriedade hidrofóbica da cafeína permite que essa molécula tenha passagem facilitada por todas as membranas biológicas, não havendo restrição de acesso ao SNC pela barreira hematoencefálica (Lachance et al., 1983; Tanaka et al., 1984). O metabolismo da cafeína ocorre predominantemente no fígado. O sistema enzimático microsomal hepático catalisa a biotransformação da cafeína em seus metabólitos paraxantina, teofilina e teobromina (Arnaud, 1987).

A meia-vida da cafeína é muito menor em ratos (42-90 minutos) do que em humanos (150-270 minutos) (Morgan et al., 1982). Por essa razão, em

estudos utilizando ratos há correção da dose administrada para critério de comparação com humanos. Assume-se que 10 mg/kg de cafeína em um rato equivale a 250 mg de cafeína em um adulto pesando 70 kg (i.e 3,5 mg/kg), o que corresponde a quantidade de cafeína presente em duas a três xícaras de café (Fredholm et al., 1999)

1.12. MECANISMO DE AÇÃO DA CAFEÍNA NO SNC

Os efeitos da cafeína podem ser mediados por diferentes mecanismos: (1) antagonismo dos receptores A_1 e A_{2A} , (2) inibição das fosfodiesterases, (3) liberação do cálcio intracelular e (4) bloqueio dos receptores $GABA_A$. Entretanto, o único mecanismo relevante para os efeitos da cafeína em doses usualmente consumidas é o antagonismo dos receptores A_1 e A_{2A} . Para a ingestão de uma xícara de café contendo a dose usual de 0,4 a 2,5 mg/kg de cafeína, estima-se que o pico de concentração plasmática em um adulto varia de 1 mM a 10 mM. Nessas concentrações, a cafeína promove efetivo antagonismo dos receptores A_1 e A_{2A} , mas uma concentração 20 vezes maior inibe as fosfodiesterases, 40 vezes maior bloqueia os receptores $GABA_A$ e 100 vezes maior mobiliza o cálcio intracelular (Fredholm et al., 1999).

O antagonismo exercido pela cafeína sobre os receptores de adenosina A_1 e A_{2A} é o mecanismo pelo qual a cafeína promove seus efeitos estimulantes no SNC. Uma vez que a adenosina via receptores A_1 desempenha papel inibitório sobre a neurotransmissão dopaminérgica, colinérgica e glutamatérgica (Flagmeyer et al., 1997; Golembiowska e Zylewska, 1997; Okada et al., 1996;

Wood et al., 1989 e a neurotransmissão dopaminérgica tem papel na determinação do estado de alerta, o efeito psicoestimulante da cafeína foi muito relacionado ao antagonismo dos receptores A_1 . Como existe uma interação entre os receptores A_{2A} e os receptores dopaminérgicos D_2 no estriado, essa interação ajuda a explicar o efeito da cafeína sobre a locomoção, pois ao bloquear o efeito modulatório negativo dos receptores A_{2A} sobre os receptores dopaminérgicos D_2 , a cafeína permite a potenciação da neurotransmissão dopaminérgica (Ferré et al., 1997).

1.13. CAFEÍNA E DESEMPENHO COGNITIVO

O conceito de cognição é complexo e envolve os processos de formação de memória, atenção, funções executivas, percepção, linguagem e funções psicomotoras. Diversos estudos concluíram que o consumo agudo (Haskell et al., 2005; Heatherley et al., 2005; ; Lieberman et al., 2002; Rees et al., 1999) ou crônico (Beaumont et al., 2001; Jarvis, 1993; Patat et al., 2000) de cafeína melhora o desempenho da memória em voluntários saudáveis. No entanto, outros estudos relataram efeito mínimo ou nenhum da cafeína sobre a memória (Bichler et al., 2006; Childs e Wit, 2006; Hogervorst et al., 2008), o que questiona a classificação da cafeína como uma substância capaz de melhorar o desempenho cognitivo. Portanto, apesar dos problemas metodológicos dos estudos com humanos, as evidências indicam que o consumo moderado e contínuo de cafeína pode, no máximo, conferir efeitos benéficos médios sobre a cognição. Estudos em animais também sugerem que o consumo de doses moderadas de cafeína melhora o desempenho da memória em roedores (Costa

et al., 2008b), enquanto altas doses (30–100 mg/kg) administradas agudamente comprometem a aquisição da memória (Angelucci et al., 2002; Corodimas et al., 2000).

Apesar do possível efeito da cafeína como uma substância que melhora o desempenho cognitivo, o efeito benéfico da cafeína parece ser mais evidente em condições nas quais o desempenho cognitivo está comprometido, como estresse, envelhecimento, depressão, DA e transtorno de déficit de atenção (Cunha e Agostinho, 2010).

ENVELHECIMENTO

O processo natural de envelhecimento é um dos fatores mais consistentes na determinação do declínio cognitivo (Buckner, 2004). Foi observado que a cafeína foi eficaz na prevenção do comprometimento da memória induzido pelo envelhecimento em roedores (Costa et al., 2008a). Prediger et al., 2005). Em humanos, a cafeína também tem efeito positivo sobre a cognição durante o envelhecimento (Hameleers, 2000).

1.14. CAFEÍNA E DOENÇA DE ALZHEIMER

Evidências substanciais de estudos epidemiológicos sugerem que a cafeína pode ser eficaz na prevenção da DA. Resultados recentes do estudo Fatores de Risco Cardiovascular, Envelhecimento e Demência (CAIDE) indicam que o consumo de três a cinco xícaras de café por dia está associado

a uma redução de 64% no risco de DA em um seguimento de 21 anos (Eskelinen et al., 2010). Ainda, um estudo retrospectivo de caso-controle conduzido por Maia e Mendonça (Maia e Mendonça, 2002) relatou que pacientes com DA haviam consumido significativamente menos cafeína nos 20 anos precedentes ao diagnóstico na comparação com indivíduos da mesma idade sem DA.

Há ainda importantes evidências do papel benéfico da cafeína em modelos animais de DA. Uma vez que roedores não desenvolvem espontaneamente as alterações relacionadas à DA, três estratégias têm sido utilizadas para reproduzi-la nesses animais: (1) utilização de camundongos transgênicos portadores de mutações em genes codificadores da APP e da proteína tau, (2) administração i.c.v. de fragmentos da forma solúvel do peptídeo A β e (3) administração i.c.v. de STZ (Arendash et al., 2006; Dall'Igna et al., 2007; Mayer et al. 1990).

Em camundongos transgênicos com mutação no gene codificador da APP, a administração de cafeína na água de beber (0,3 mg/ml) por um período de seis meses amenizou o déficit de memória desses animais (Arendash et al, 2006). Tanto em camundongos transgênicos envelhecidos quanto adultos, a administração aguda de cafeína reduziu os níveis do A β do fluido intersticial encefálico e plasmático. Ainda, em camundongos transgênicos envelhecidos também houve redução dos depósitos de A β em hipocampo e córtex quando submetidos ao tratamento crônico com cafeína (Cao et al, 2009). Outro estudo demonstrou que a cafeína pode não ser apenas profilática, mas também reverter déficits mnemônicos já presentes, pois o tratamento com cafeína na

água de beber por um período de quatro a cinco semanas reverteu o desempenho previamente comprometido da memória de trabalho em camundongos transgênicos (Arendash et al, 2009). O efeito da cafeína também foi avaliado no modelo de DA induzida pela administração i.c.v. de fragmentos do A β . O tratamento com cafeína na água de beber durante 12 dias associado a uma única injeção intraperitoneal de cafeína trinta minutos antes da administração i.c.v. do peptídeo A β preveniu o comprometimento da memória em camundongos nas tarefas de esquiva inibitória e labirinto em Y (Dall'Igna et al, 2007).

2. OBJETIVOS

- I. Avaliar o desempenho da memória de reconhecimento em ratos adultos submetidos ao modelo de demência por infusão i.c.v. de STZ.

- II. Analisar o imunoconteúdo e expressão dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} do hipocampo em modelo de demência esporádica.

- III. Verificar o efeito do tratamento prévio com cafeína sobre o desempenho da memória de reconhecimento nesse modelo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos pesando entre 200 e 250 gramas provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio grande do Sul. Os animais foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12h/12h em uma temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ com acesso livre a água e comida.

3.2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram submetidos à anestesia com ketamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e então colocados no aparato estereotáxico. Foi realizada uma incisão sagital no escalpo do animal e o crânio raspado até a visualização da sutura bregmática. A partir do bregma, os ventrículos laterais foram localizados de acordo com as seguintes coordenadas: 0,9 mm posterior ao bregma, 1,5 mm lateral à sutura sagital e 3,6 mm dorsoventral a partir da superfície encefálica. Os animais então receberam uma infusão bilateral de 5 μL de STZ (3 mg/kg, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) ou veículo (solução salina) utilizando uma seringa Hamilton. Após a cirurgia, os animais foram colocados em uma placa aquecida para manutenção da temperatura corporal a $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ até completa recuperação da anestesia.

3.3. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Os testes comportamentais foram realizados por experimentadores experientes em um ambiente isolado de som e com condições adequadas de luminosidade. As caixas de comportamento foram cuidadosamente limpas antes de testar cada animal. Todos os experimentos comportamentais foram realizados entre 8h e 12h para evitar influências do ritmo circadiano.

Campo Aberto

O teste do campo aberto foi realizado para avaliar a atividade locomotora dos animais. Os animais alocados individualmente em uma arena de madeira medindo 50 x 25 x 50 cm e filmados durante 5 minutos utilizando o software especializado ANY-maze (Stoelting, Wood Dale, Illinois, EUA) A medida da atividade locomotora foi realizada considerando a distância total percorrida pelo animal durante o teste.

Tarefa do Reconhecimento do Objeto Novo

A tarefa de reconhecimento do objeto novo é um protocolo baseado na tendência natural do animal em explorar o ambiente e discriminar o novo. Essa tarefa não possui componente aversivo e envolve apenas uma sessão de treinamento (Bevins e Besheer, 2006).

A memória de reconhecimento é uma memória de trabalho que possui dois fenômenos: o ato de recordar e a familiaridade (Ennaceur e Delacour, 1988; Eichenbau et al., 2007). As áreas encefálicas envolvidas nesses dois fenômenos ainda vêm sendo estudadas, mas a participação do hipocampo parece fundamental (Squire et al, 2007), uma vez que o comprometimento dessa estrutura prejudica o desempenho da memória na tarefa de reconhecimento de objeto novo (Clark et al., 2000; Hammond et al., 2004).

Nessa tarefa, o animal é apresentado a dois objetos idênticos e, posteriormente, o animal é apresentado a um dos objetos apresentado previamente juntamente com um objeto novo. Os objetos são do mesmo tamanho, mas podem ter cor e/ou textura diferente na segunda fase. Previamente, os animais são habituados ao aparato para diminuição da ansiedade e do estresse causados pelo ambiente novo. Após a habituação, os animais são submetidos a duas sessões diferentes. Na primeira sessão (treino) os animais são colocados no aparato com dois objetos idênticos para serem explorados por 5 minutos. A seguir, o animal é retirado do aparato e, após um intervalo de 90 minutos, é realizada a segunda sessão (teste). No teste, um dos objetos é substituído por outro suficientemente diferente (objeto novo) e, novamente, o animal é colocado no aparato para exploração durante 5 minutos. O tempo que o animal explora cada um dos objetos durante o treino e o teste é registrado para as análises pertinentes ao delineamento do estudo.

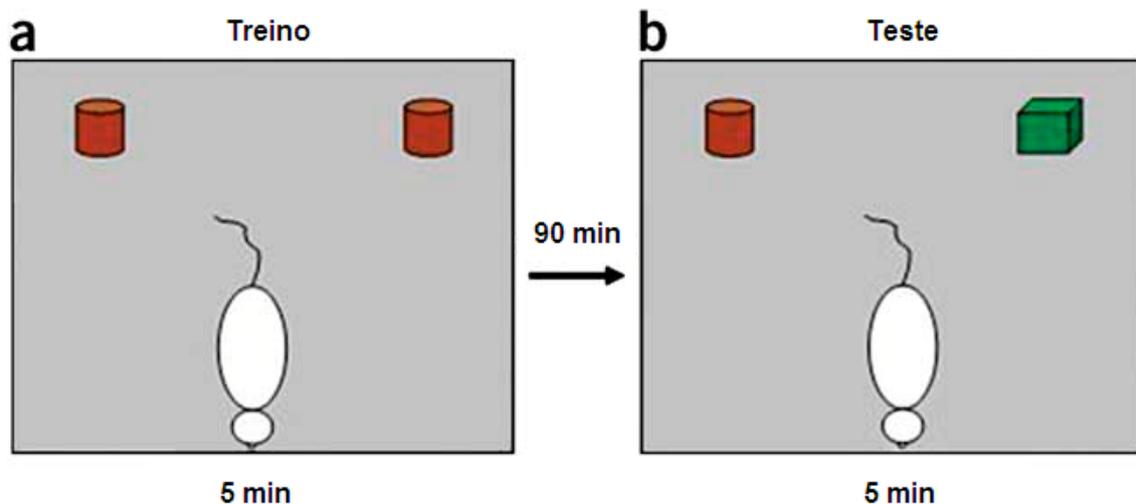


Figura 3. Representação da tarefa de reconhecimento do objeto novo (Adaptado de Bevins e Besheer, 2006).

3.4. WESTERN BLOT

Os hipocampus dos animais foram dissecados, imediatamente homogenizados em SDS 5% (*sodium dodecyl sulfate*) com coquetel de inibidor de protease (Sigma, São Paulo/Brasil) e congelados a -70°C . Após descongelamento, o conteúdo protéico de cada amostra foi determinado utilizando o método do ácido bicinonínico usando albumina bovina (BSA) (Pierce, São Paulo/Brazil) como padrão. Após quantificação do conteúdo protéico, as amostras foram diluídas a uma concentração final de $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ em tampão SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada em gel SDS-PAGE de concentração 12 % e 4 % após aplicação de $40\mu\text{g}$ de cada amostras e um padrão de peso molecular (Bio-Rad, São Paulo/Brazil). Após eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas com salina tamponada com Tris contendo 0,1% de Tween-20 e 3% de albumina bovina por 1h. As membranas foram então incubadas por 24h à 4°C com anticorpo rabbit anti-

adenosine A₁ antibody (1:1000; Affinity Bioreagents, U.S.A) ou goat anti-adenosine A_{2A} (1:500; Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.). Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários conjugados horseradish-peroxidase por 2h em temperatura ambiente e reveladas com kit de quimiluminescência kit (Amersham, São Paulo/Brasil). Os filmes auto-radiográficos foram digitalizados e a análise densitométrica foi realizada utilizando o programa de imagem do NIH (desenvolvido nos EUA pelo *National Institutes of Health* e disponível na Internet no endereço <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). O controle da quantidade de proteína aplicado para cada amostra foi realizado utilizando β -tubulina. As membranas foram incubadas por 24h a 4 °C com mouse anti- β -tubulin (1:1000), lavadas e incubadas com um anticorpo secundário anti-mouse IgG horseradish-peroxidase por 2h em temperatura ambiente e analisadas conforme descrito acima.

3.5. qPCR

Os hipocampus dos animais foram dissecados em condições estéreis, coletados em tubos de polipropileno livres de RNase, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e então armazenados a -80 °C. O RNA total foi extraído utilizando o kit RNAqueous® Kit (Ambion, Inc., USA) de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade, pureza e concentração do RNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% e espectrofotometria. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 0,5 μ g de RNA total utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix

(Invitrogen São Paulo/SP, Brasil). O cDNA de cada amostra foi então aliquotado e armazenado a -20°C até utilização. As reações de qPCR foram realizadas em triplicatas contendo $0.1\ \mu\text{M}$ de cada oligômero específico, $0.5\ \text{ng}/\mu\text{l}$ de cDNA e Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG com ROX (Invitrogen São Paulo/SP, Brasil). O seguinte ciclo foi utilizado: 2 minutos a 50°C , 2 minutos a 95°C , seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos. A média dos valores de Ct das triplicatas foram utilizadas para o cálculo da expressão dos genes de interesse, normalizado pelo gene endógeno *Tbp* (Santos e Duarte, 2008) utilizando a fórmula $2^{-\Delta\text{Ct}}$, conforme previamente descrito (Schmittgen e Livak, 2008).

Tabela 1. Oligômeros utilizados na reação de qPCR

Oligômero	Sequência
<i>Adora1</i> senso	5' TCCGAGTCAAGATCCCTCTC 3'
<i>Adora1</i> antisenso	5' GTCTTGCTCTACCACACTCAG 3'
<i>Adora2a</i> senso	5' CTTCGCCTGTTTTGTCCTG 3'
<i>Adora2a</i> antisenso	5' CCTCACACCTGTCACCAAG 3'

3.6. TRATAMENTO COM CAFEÍNA

Os animais foram tratados por duas semanas com água de beber ou cafeína ($1\ \text{mg}/\text{mL}$) previamente à administração i.c.v. de STZ ou veículo. Após a infusão i.c.v, os animais foram submetidos a mais quatro semanas de

tratamento com água de beber ou cafeína. Ao final dos tratamentos, foi realizada a avaliação da atividade locomotora em um campo aberto e o teste de reconhecimento de objetos.

3.7. Análise Estatística

Para a análise da atividade locomotora no campo aberto, Western blot e qPCR foi utilizado teste-t não pareado. Os dados do tempo de exploração total, tempo de exploração do objeto familiar e reconhecimento de objetos foram analisados utilizando ANOVA de duas vias com medidas repetidas. A ANOVA de três vias com medidas repetidas foi utilizada para avaliar o efeito do tratamento com cafeína na tarefa do reconhecimento de objetos. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e considerados estatisticamente significativos para $P < 0,05$

4. RESULTADOS

**ADENOSINE A_{2A} RECEPTORS IMMUNOCONTENT IS INCREASED IN THE
HIPPOCAMPUS FROM A RAT MODEL OF SPORADIC DEMENTIA**

Janaína Espinosa¹, Marcelo S. Costa¹, Fernanda Nunes¹, Vanessa Schein¹, Vanessa
Kazlauckas¹, Eduardo Kalinine¹, Diogo O. Souza¹, Rodrigo A. Cunha², Lisiane O.
Porciúncula¹

¹Federal University of Rio Grande do Sul, Health and Basic Sciences Institute,
Department of Biochemistry, Porto Alegre/RS, Brazil 90035-003, and ²Center for
Neurosciences of Coimbra, Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3004-517
Coimbra, Portugal.

Running title: Up-regulation of A_{2A} receptors in dementia

Correspondence to: Lisiane O. Porciúncula, Federal University of Rio Grande do Sul,
Health and Basic Sciences Institute, Department of Biochemistry, Porto Alegre/RS,
Brazil 90035-003; e-mail: loporciuncula@gmail.com

Key words: adenosine, A_{2A} receptor, A₁ receptor, Alzheimer's disease, memory,
streptozotocin

ABSTRACT

Intracerebroventricular (icv) streptozotocin (STZ) administration disrupts insulin signaling and induces pathological and behavioral alterations resembling Alzheimer's disease (AD), being considered an experimental model of sporadic AD. Recent reports suggest that the manipulation of adenosine receptors modify the course of memory impairment in experimental models of AD. However, the impact of dementia on the expression and density of adenosine receptors is unclear, which was now tested. Adult male rats received a bilateral infusion of saline (0.9 %) or STZ (3 mg/kg, icv), which disrupts insulin signaling and triggers memory impairment. Accordingly, four weeks later, STZ-treated rats displayed impaired object recognition memory. This was accompanied by an increased immunocontent of adenosine A2A receptors (A2AR) in the hippocampus, whereas A1R immunocontent was unaffected. Additionally, no changes in the expression of hippocampal A1R or A2AR mRNA was observed. These findings provide a rationale to understand the ability of either caffeine or selective A2AR antagonists to selectively prevent memory impairment.

INTRODUCTION

The cardinal modification of Alzheimer's disease (AD) is the deterioration of memory. A major risk factor for the development of AD is diabetes (Biessels, 2010). In fact, impaired cerebral glucose utilization and metabolism are present at initial stages of cognitive impairment (Hoyer, 2004; Iwangoff et al., 1980; Sims et al., 1980). Also, patients with lower cerebrospinal insulin levels display impaired cognitive skills compared with age-matched controls (Craft et al., 1996; 1998; 2003), suggesting that brain insulin signaling is also impaired in AD (de la Monte and Wands, 2005; Rivera et al., 2005; Steen et al., 2005). These findings lead to the proposal that AD might constitute a "type 3 form of diabetes" and that the experimental disruption of brain insulin signaling might represent an experimental model of sporadic AD. Accordingly, the intracerebroventricular (icv) infusion of streptozotocin (STZ) in rats disrupts brain insulin signaling triggering progressive memory impairment (Hoyer, 2004; Lannert and Hoyer, 1998; Salkovic-Petrisic et al., 2006; Shoham et al., 2003, 2007).

Adenosine is a prototypical neuromodulator controlling neuronal excitability and brain metabolism mainly through the activation of inhibitory A₁ receptors (A₁R) and facilitatory A_{2A}R (Fredholm et al., 2005). The interest in this adenosine modulation system was bolstered by the combined observation that it seems to be the main molecular target of caffeine (Fredholm et al., 2005) and that either caffeine or selective adenosine receptor ligands profoundly affect brain dysfunction and neurodegeneration (Cunha, 2005; Chen et al., 2007). In particular, both caffeine and selective A_{2A}R antagonists effectively counteract memory impairment in conditions such as aging, diabetic neuropathy or AD, both in humans and in experimental models (reviewed in Takahashi et al., 2008; Cunha and Agostinho, 2010). In most models of brain disease, the neuroprotective properties of caffeine and of A_{2A}R antagonists are argued to result

from an up-regulation of cortical A2AR, associated with a down-regulation of A1R (reviewed in Cunha, 2005; Cunha and Agostinho, 2010). However, the impact of AD on the expression and density of adenosine receptors is at odds with this general scenario. Thus, an initial study in necropsic cortical tissue of AD patients reported a predominant increase of A1R immunoreactivity in degenerating neurons with neurofibrillary tangles and in dystrophic neurites of senile plaques, accompanied by a comparatively modest increase of A2AR density (Angulo et al., 2003). A subsequent study, also in necropsic cortical tissue of AD patients, reported a simultaneous enhancement of A1R and A2AR densities without changes in their mRNA expression levels (Albasanz et al., 2008). The only study in rodents reported an up-regulation of cortical A1R and hippocampal A2AR proteins in a transgenic mouse model of AD (APP Swedish mutation mouse) without changes in their mRNA expression levels (Arendash et al., 2006). This is in marked contrast with the modification of the density of cortical adenosine receptors in other models of brain degeneration (reviewed in Cunha, 2005), such as for instance models of peripheral type I diabetes experimentally induced by peripheral STZ administration, which cause an up-regulation of A2AR together with a down-regulation of A1R in the hippocampus (Duarte et al., 2006), accompanied by modest memory impairment prevented by caffeine (Duarte et al., 2009).

Thus, we now took advantage of the ability of centrally injected STZ to cause a progressive memory impairment, to explore its impact on the expression and on the density of adenosine receptors in the hippocampus of these memory-impaired rats.

Materials and methods

Animals

Adult male Wistar rats (200-250 g) were maintained under a 12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 am), constant temperature (22 ± 1 °C) and with free access to food and water. All behavioral tests were performed between 8:00 am and 12:00 pm. All the experimental procedures were designed to minimize the number of animals used and their suffering and were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Rio Grande do Sul (Protocol n° 2008223).

Stereotaxic surgery

Rats were anesthetized with ketamine (75 mg/kg, i.p.) and xylazine (10 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus. The lateral ventricles were bilaterally accessed (coordinates: 0.9 mm posterior to bregma; 1.5 mm lateral to sagittal suture; 3.6 mm beneath the surface of brain) and the rats received a single bilateral infusion of 5 μ L STZ (3 mg/kg) or vehicle (0.9 % w/v). After the surgical procedure, rats were placed on a heating pad to maintain body temperature at 37.5 ± 0.5 °C until recovery from anesthesia.

Behavioral analysis

Open field: Four weeks after STZ or vehicle infusion, rats were evaluated in the open field test to evaluate locomotion. The apparatus was made of black-painted Plexiglas

measuring 50 x 50 cm and was surrounded by 50 cm high walls. Each rat was placed in the center of the arena and the distance traveled was recorded during 5 minutes. The experiments were conducted in a sound-attenuated room under low-intensity light (12 lx); activity was recorded with a video camera positioned above the arena and monitored in an adjacent room by an observer blind to the treatment of the animals. Locomotion was measured as the total distance traveled in meters (m) calculated using a computer-operated tracking system (Any-maze, Stoelting, Woods Dale, IL).

Novel object recognition task: the object recognition test was carried out 24 hours after habituation in the open field apparatus. Rats first underwent a training session, where two identical objects were placed near the two corners at either end of one side of the chamber. The objects presented similar textures, colors and sizes, but different shapes (see Bevins & Besheer, 2005). Rats were placed individually into the open field facing the center of the opposite wall and allowed to explore the objects during 5 minutes. The test session was performed 90 minutes after training and two dissimilar objects were presented, a familiar one and a novel one. Exploration was defined by directing the nose to the object at a distance of at least 2 cm and/or touching the object with the nose or forepaws. Hearing on to object was not considered exploratory behavior. The novel object recognition index was defined as: $TN / (TN + TF)$, [TN= time spent exploring the novel object; TF= time spent exploring familiar object] and was ranked manually by 2 observers blind to treatments.

Western blot analysis of A₁ and A_{2A} receptor density

Twenty-four hours after behavioral tests, rats were killed by cervical displacement; and one hippocampus was dissected out and immediately homogenized in a 5% SDS

solution containing a protease inhibitor cocktail (Sigma, São Paulo/Brazil) and frozen at -70 °C. After defrost, the protein content was determined using the bicinchoninic acid assay (Pierce, São Paulo/Brazil). Sample extracts were diluted to a final protein concentration of 2 µg/µL in SDS-PAGE buffer and SDS-PAGE analysis was carried out with 40 µg (for A1R) or 100 µg (for A2AR) together with pre-stained molecular weight standards (Bio-Rad, São Paulo/Brazil) using a 12% gel with 4% concentrating gel. After electro-transfer, the membranes were blocked with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) and 3% bovine serum albumin during 1 hour. The nitrocellulose membranes (Amersham) were then incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-A1R antibody (1:1000; Affinity Bioreagents, USA) or goat anti-A2AR antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology, USA). The membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 2 hours at room temperature and developed with chemiluminescence ECL kit (Amersham, São Paulo/Brazil). Densitometric analyses were performed using public domain NIH Image Program (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). β-Tubulin was used as a loading control using a mouse anti-β-tubulin antibody (1:1000), analyzed as described above.

Quantitative-PCR (qPCR) of A₁ and A_{2A} receptor mRNA expression

Twenty-four hours after behavioral tests, rats were killed by cervical displacement; and one hippocampus was dissected out in sterile conditions, collected in RNase-free polypropylene tubes, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Total RNA was extracted with RNAqueous® Kit (Ambion Inc., USA) according to manufacturer's instructions. RNA integrity, purity and concentration were checked by electrophoresis in 1% agarose gel and spectrophotometry. First strand cDNA was

synthesized from 0.5 µg of total RNA using SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen São Paulo/SP, Brazil). Each cDNA pool was then aliquoted and stored at -20 °C.

Gene sequence information of *Adora2a* (NCBI reference sequence NP_445746.3) and *Adora1* (NCBI reference sequence NP_058851.2) was collected from databases (www.ncbi.nlm.nih.gov and www.ensembl.org). Specific primers for each gene were designed using the IDT Design Software (Integrated DNA Technologies Inc., USA) taking care to avoid primers that could generate secondary structures (primers and template). The primers for *Adora1* (forward: 5' TCCGAGTCAAGATCCCTCTC 3'; reverse: 5' GTCTTGCTCTACCACACTCAG 3') were designed between exons 1 and 2 and the primers for *Adora2a* (forward: 5'-TCTTCGCCTGTTTTGTCCTG-3'; reverse: 5'-CCTCACACCTGTCACCAAG-3') between exons 2 and 3. Two reference genes (*Tbp* and *Pgk1*) (Santos and Duarte, 2008) were run as controls and the results are expressed using *Tbp* levels. All primer sequences were assessed for specificity using non-redundant basic local alignment search tools (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) and target-specific sequence alignment programs.

qPCR reactions were performed in triplicate and contained 0.1 µM of each specific primer, 0.5 ng/ul cDNA and Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen Corp., USA). The following thermal cycling conditions were used for qPCR: 2 min at 50° C, 2 min at 95° C, followed by 40 cycles of 95° C for 15 s, 60° C for 30 s. Under these conditions, qPCR produced a single sequence at a specific melting temperature for each gene analyzed. Control reactions were performed to verify that no amplification occurred without cDNA. The mean Ct values from triplicate measurements were used to calculate expression of the target gene, with normalization to internal control (*Tbp*) using the $2^{-\Delta Ct}$ formula (Schmittgen & Livak, 2008).

Statistical analysis

Unpaired Student's *t*-test was used for statistical analysis of open field, Western blot and qPCR data. Two-way ANOVA with repeated measures (treatment *versus* trials and trials as repeated measures) were used for the novel object recognition data. Data were expressed as means \pm SEM and differences were considered statistically significant for $P < 0.05$.

Results

Behavioral analysis

We first determined that STZ treatment did not affect locomotor activity. Thus, the traveled distance during the open field test was not different ($t = 0.4458$; $P = 0.6611$) between vehicle and STZ-treated rats (Fig. 1A).

During analysis of the object recognition test, we first report a significant effect of trials [$F(1,18) = 6.01$, $P = 0.0246$], whereas the effect of treatment and the interaction between treatment and trials was not statistically significant. Thus, both control and STZ-treated rats spent equally less time on both objects during the test session. The time spent on the familiar object was also analyzed and two-way ANOVA revealed a significant effect only for trials [$F(1,18) = 12.50$, $P = 0.0024$]. As a natural behavior, rats spent less time exploring the familiar object during test session. However, STZ-treated rats also spent less time exploring the familiar object in the test session, thus resulting in values higher than these obtained for vehicle-treated rats. Overall this enables the comparison of behavior in this test to evaluate modifications of memory performance.

For the object recognition index, two-way ANOVA analysis revealed a significant effect of trials [$F(1,18) = 8.43, P = 0.0095$]. Furthermore, the treatment yielded a significant effect [$F(1,18) = 11.58, P = 0.0032$] and there was a significant interaction between trials and treatment [$F(1,18) = 7.18, P = 0.0153$]. Thus, STZ-treated rats displayed a robust impairment on object recognition task performance when compared to control (vehicle-treated) rats (Fig. 1B).

Modification of the density and expression of hippocampal A1R and A2AR

The immunocontent of A1R was not modified by infusion of STZ when compared to vehicle-treated rats 4 weeks after treatment (Fig. 2A). However, the immunocontent of A2AR was increased (60%) in the hippocampus of STZ- compared to vehicle-treated rats ($t = 5.232; P = 0.0012$) (Fig. 2B).

As shown in Figure 2C and D, neither the expression of A1R nor of A2AR was modified in the hippocampus of STZ- compared to vehicle-treated rats.

Discussion

The present results confirm the memory impairment resulting from the intracerebroventricular (icv) administration of streptozotocin (STZ), now using an object recognition memory test. This test focuses on short-term memory performance (see Sik et al., 2003), precisely the memory domain more precociously affected in Alzheimer's disease (AD) (see Selkoe, 2001). This finding re-enforces the previous evidence supporting that the icv infusion of STZ might be a relevant model for sporadic dementia since it recapitulates the progressive deterioration of memory and triggers

different biochemical and morphological hallmarks of AD (Lannert & Hoyer, 1998; Steen et al., 2005; Lester-Coll et al., 2006; Salkovic-Petrisic et al., 2006; Grünblatt et al., 2007). This is an expected correlate of the documented impact of insulin on memory performance (Zhao et al., 1999; de la Monte and Wands, 2005) and the observed impairment of brain insulin signaling in AD (de la Monte and Wands, 2005; Rivera et al., 2005; Steen et al., 2005).

Using this STZ-based model for sporadic dementia, we now report that memory impairment is accompanied by an increased density of adenosine A_{2A} receptors (A2AR), without modification of A1R in the hippocampus. This is in close agreement with the majority of studies exploring the modifications of the density of adenosine receptors in the limbic and cerebral cortices in animal models of different conditions characterized by memory impairment (reviewed in Cunha & Agostinho, 2010). In fact, in conditions such as aging (Canas et al., 2009a), type I diabetes (Duarte et al., 2009), early-life convulsions (Cognato et al., 2010) or restraint stress (Cunha et al., 2006), there is a memory impairment accompanied by an imbalance of the density of hippocampal adenosine receptors, bolstering the relevance of A2AR. This provides a rationale to understand the particular ability of caffeine (a non-selective adenosine receptor antagonist) to selectively prevent memory deterioration in each of these experimental models (Cunha et al., 2006; Costa et al., 2008; Duarte et al., 2009; Cognato et al., 2010), since this beneficial effect of caffeine is mimicked by antagonists of A2AR rather than A1R (Prediger et al., 2005; Cunha et al., 2006; Cognato et al., 2010). Since neither caffeine nor A2AR antagonists cause any evident improvement of memory performance in control animals, only a disease-associated imbalance in the molecular targets of caffeine, i.e. A1R and A2AR (see Fredholm et al., 2005), would allow understanding the striking memory-stabilizing effects of caffeine and A2AR

antagonists selectively in diseased animals (discussed in Cunha & Agostinho, 2010). Since caffeine also prevents memory impairment in different animal models of AD (Arendash et al., 2006; Dall'Igna et al., 2007; Chen et al., 2008), an effect mimicked by A2AR blockade (Canas et al., 2009b) but unaffected by A1R antagonists (Dall'Igna et al., 2007), one would expect that animal models of Alzheimer's disease should also display an imbalance of the density of cortical adenosine favoring A2AR. This is precisely the major finding that is now reported.

In spite of the relevance of the present finding to assist comprehending the memory preserving effects of caffeine, the mechanisms underlying this dementia-associated modification of the density of hippocampal A2AR still remain to be defined. In fact, we also observed that there is no major change in the levels of mRNA encoding for both receptors. This indicates that it might not be changes in the expression of the A1R and A2AR genes that are directing changes in the density of A1R and A2AR proteins, in spite of the existence of several major regulators of the promoter region of the A2AR gene (Lee et al., 2003; Chiang et al., 2005; Morello et al., 2006; Ahmad et al., 2009). Instead, it might be a modification of the trafficking and/or stability of the A2AR protein that is directing the enhanced density of A2AR in memory impaired animals. A2AR are known to have different subcellular localization in different membrane domains (Assaife-Lopes et al., 2010) and they can couple to different ancillary protein and recruit different transducing system (Zezula & Freissmuth, 2008), often displaying different susceptibility to desensitization (reviewed in Fredholm et al., 2005). Thus, albeit there is emerging information to conceive a possible direct regulation of the stability of A2AR protein, the exact mechanism underlying the enhanced stability of A2AR protein upon memory impairment still remains to be resolved.

In summary, the present observation that the induction of memory impairment in an STZ-based rat model of sporadic AD causes an imbalance in the density of hippocampal adenosine receptors favoring A2AR, provides a rationale to understand the particular ability of caffeine to prevent memory impairment associated with AD both in animal models as well as in humans (reviewed in Cunha & Agostinho, 2010).

Acknowledgments

This work was supported by INCT Excitotoxicity and Neuroprotection / CNPq, Brazilian Neuroscience Network (IBNnet), CNPq (L.O.Porciúncula, Proc. n° 472216/2009-0) and CAPES. RAC thanks the financial support of FCT.

References

Ahmad, A., Ahmad, S., Glover, L., Miller, S.M., Shannon, J.M., Guo, X., Franklin, W.A., Bridges, J.P., Schaack, J.B., Colgan, S.P., White, C.W., 2009. Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2alpha in pulmonary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 10684-10689.

Albasanz, J.L., Perez, S., Barrachina, M., Ferrer, I. & Martín, M., 2008. Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.*, 18, 211-219.

Angulo, E., Casadó, V., Mallol, J., Canela, E.I., Vinals, F., Ferrer, I., Lluís, C. & Franco, R., 2003. A1 adenosine receptors accumulate in neurogenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol.*, 13, 440–451.

Arendash, G.W., Schleif, W., Rezai-Zadeh, K., Jackson, E.K., Zacharia, C., Cracchiolo, J.R., Shippy, D. & Tan, J., 2006. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β -amyloid production. *Neuroscience*, 142, 941–952.

Assaife-Lopes, N., Sousa, V.C., Pereira, D.B., Ribeiro, J.A., Chao, M.V., Sebastiao, A.M., 2010. Activation of adenosine A_{2A} receptors induces TrkB translocation and increases BDNF-mediated phospho-TrkB localization in lipid rafts: implications for neuromodulation. *J Neurosci.*, 30, 8468-8480.

Bevins, R.A. & Besheer, J., 2006. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nature Protoc.*, 1, 1306-1311.

Biessels, G.J., 2010. Caffeine, diabetes, cognition, and dementia. *J. Alzheimers Dis.*, 20(Suppl.1), S143-S150.

Canas, P.M., Duarte, J.M., Rodrigues, R.J., Köfalvi, A. & Cunha, R.A., 2009a. Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus. *Neurobiol. Aging.*, 30, 1877-1884.

Canas, P.M., Porciúncula, L.O., Cunha, G.M., Silva, C.G., Machado, N.J., Oliveira, J.M., Oliveira, C.R. & Cunha, R.A., 2009b. Adenosine A_{2A} receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by β -amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.*, 29, 14741-14751.

Chen, J.F., Sonsalla, P.K., Pedata, F., Melani, A., Domenici, M.R., Popoli, P., Geiger, J., Lopes, L.V., de Mendonça, A., 2007. Adenosine A_{2A} receptors and brain injury:

broad spectrum of neuroprotection, multifaceted actions and "fine tuning" modulation. *Prog. Neurobiol.*, 83, 310-331.

Chen, X., Gawryluk, J.W., Wagener, J.F., Ghribi, O. & Geiger, J.D., 2008. Caffeine blocks disruption of blood brain barrier in a rabbit model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 5, 12.

Chiang, M.C., Lee, Y.C., Huang, C.L. & Chern, Y., 2005. cAMP-response element-binding protein contributes to suppression of the A_{2A} adenosine receptor promoter by mutant Huntingtin with expanded polyglutamine residues. *J. Biol. Chem.*, 280, 14331-14340.

Cognato, G.P., Agostinho, P.M., Hockemeyer, J., Müller, C.E., Souza, D.O. & Cunha, R.A., 2010. Caffeine and an adenosine A_{2A} receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. *J. Neurochem.*, 112, 453-462.

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

Craft, S., Newcomer, J., Kanne, S., Dagogo-Jack, S., Cryer, P., Sheline, Y., Luby, J., Dagogo-Jack, A. & Alderson, A., 1996. Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 17, 123-130.

Craft, S., Peskind, E., Schwartz, M.W., Schellenberg, G.D., Raskind, M. & Porte, Jr.D., 1998. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology*, 50, 164-168.

Craft, S., Asthana, S., Cook, D.G., Baker, L.D., Cherrier, M., Purganan, K., Wait, C., Petrova, A., Latendresse, S., Watson, G.S., Newcomer, J.W., Schellenberg, G.D. & Krohn, A.J., 2003. Insulin dose-response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: interactions with apolipoprotein E genotype. *Psychoneuroendocrinol.*, 28, 809-822.

Cunha, R.A., 2005. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade. *Purinergic Signal.*, 1, 111-134.

Cunha, R.A. & Agostinho, P.M., 2010. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J. Alzheimers Dis.*, 20(Suppl.1), S95-S116.

Cunha, G.M., Canas, P.M., Oliveira, C.R. & Cunha, R.A., 2006. Increased density and synapto-protective effect of adenosine A_{2A} receptors upon sub-chronic restraint stress. *Neuroscience*, 141, 1775-1781.

Dall'Igna, O.P., Fett, P., Gomes, M.W., Souza, D.O., Cunha, R.A. & Lara, D.R., 2007. Caffeine and adenosine A_{2a} receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp. Neurol.*, 203, 241-245.

de la Monte, S.M. & Wands, J.R., 2005. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, 7, 45-61.

Duarte, J.M., Oliveira, C.R., Ambrósio, A.F. & Cunha, R.A., 2006. Modification of adenosine A₁ and A_{2A} receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochem. Int.*, 48, 144-150.

Duarte, J.M., Carvalho, R.A., Cunha, R.A. & Gruetter, R., 2009. Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Neurochem.*, 111, 368-379.

Fredholm, B.B., Chen, J.F., Cunha, R.A., Svenningsson, P. & Vaugeois, J.M., 2005. Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol.*, 63, 191-270.

Grünblatt, E., Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic, J., Riederer, P. & Hoyer, S., 2007. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J. Neurochem.*, 101, 757-770.

Hoyer, S., 2004. Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 541, 135-152.

Iwangoff, P., Armbruster, R., Enz, A. & Méier-Ruge, W., 1980. Glycolytic enzymes from human autopic brain cortex: normal aged and demented cases. *Mech. Ageing Dev.*, 14, 203-209.

Lannert, H. & Hoyer, S., 1998. Intracerebroventricular administration of Streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav. Neurosci.*, 112, 1199-1208.

Lee, Y.C., Lai, H.L., Sun, C.N., Chien, C.L. & Chern, Y., 2003. Identification of nuclear factor 1 (NF1) as a transcriptional modulator of rat A_{2A} adenosine receptor. *Mol. Brain Res.*, 111, 61-73.

Lester-Coll, N., Rivera, E.J., Soscia, S.J., Doiron, K., Wands, J.R. & de la Monte, S.M., 2006. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 9, 13-33.

Morello, S., Ito, K., Yamamura, S., Lee, K.Y., Jazrawi, E., Desouza, P., Barnes, P., Cicala, C. & Adcock, I.M., 2006. IL-1 β beta and TNF- α regulation of the adenosine receptor A_{2A} expression: differential requirement for NF-kappa B binding to the proximal promoter. *J. Immunol.*, 177, 7173-7183.

Prediger, R.D., Batista, L.C. & Takahashi, R.N., 2005. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A₁ and A_{2A} receptors. *Neurobiol. Aging.*, 26, 957-964.

Rivera, E., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J.R. & de la Monte, S.M., 2005. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with

progression of Alzheimer's disease: Link to brain reductions in acetylcholine. *J. Alzheimers Dis.*, 8, 247-268.

Salkovic-Petrisic, M., Tribl, F., Schmidt, M., Hoyer, S. & Riederer, P., 2006. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J. Neurochem.*, 96, 1005-1015.

Santos, A.R.A., Duarte, C.B., 2008. Validation of internal control genes for expression studies: Effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, 86, 3684-3692.

Schmittgen, T.D. & Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Prot.*, 3, 1101-1108.

Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.*, 81, 741-766.

Shoham, S., Bejar, C., Kovalev, E. & Weinstock, M., 2003. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp. Neurol.*, 184, 1043-1052.

Shoham, S., Bejar, C., Kovalev, E., Schorer-Apelbaum, D. & Weinstock, M., 2007. Ladostigil prevents gliosis, oxidative–nitrate stress and memory deficits induced by

intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology*, 52, 836-843.

Sims, N.R., Bowen, D.M., Smith, C.C., Flack, R.H., Davison, A.N., Snowden, J.S. & Neary, D., 1980. Glucose metabolism and acetylcholine synthesis in relation to neuronal activity in Alzheimer's disease. *Lancet*, 1, 333-336.

Sik, A., van Nieuwehuyzen, P., Prickaerts, J. & Blokland, A., 2003. Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behav. Brain Res.*, 147, 49-54.

Steen, E., Terry, B.M., Rivera, E.J., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R. & de la Monte, S.M., 2005. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers Dis.*, 7, 63-80.

Takahashi, R.N., Pamplona, F.A. & Prediger, R.D., 2008. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. *Front. Biosci.*, 13, 2614-2632.

Zezula, J. & Freissmuth, M., 2008. The A_{2A}-adenosine receptor: a GPCR with unique features? *Br. J. Pharmacol.*, 153(Suppl.1), S184-S190.

Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M.J. & Alkon, D.L., 1999. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression,

tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J. Biol. Chem.*, 274, 34893-34902.

Fig. 1. Performance in the open field test (A) and in the object recognition test (B) of adult rats 4 weeks after the intracerebroventricular infusion of saline (0.9 g%, control) or STZ (3 mg/kg). Panel A shows the traveled distance in meters during ten minutes of video recording, displayed as means + S.E.M. (n = 10 animals per group). No significant differences were found between groups using an unpaired Student's *t*-test. Panel B shows the quantification of the recognition index, displayed as means + S.E.M. (n = 10 animals per group). * P<0.05 comparing test *versus* training session performance using a two-way ANOVA (treatment *versus* trials) and trials were used as repeated measures.

Fig. 2. Comparison of the density (A, B) and expression (C, D) of hippocampal A₁ and A_{2A} receptors, four weeks after the intracerebroventricular infusion of saline (0.9 g%, control) or STZ (3 mg/kg). Panels A and B display the immunocontent (normalized by the β-tubulin immunoreactivity) of adenosine A₁ (n= 4-5) (A) and A_{2A} receptors (n=6-7) (B) presented as means ± S.E.M. Representative Western blot examples of A₁ and A_{2A} receptors, as well as β-tubulin detection are displayed below each bar graph. Panels C and D display the quantitative real time PCR analysis of the relative mRNA levels of *Adora1* and *Adora2a* (normalized by the expression levels of the internal control gene, *Tbp*), presented as means ± S.E.M. (n= 4-5 per group). * P<0.05 comparing control *versus* STZ-treated rats using an unpaired Student's *t*-test.

Figure 1

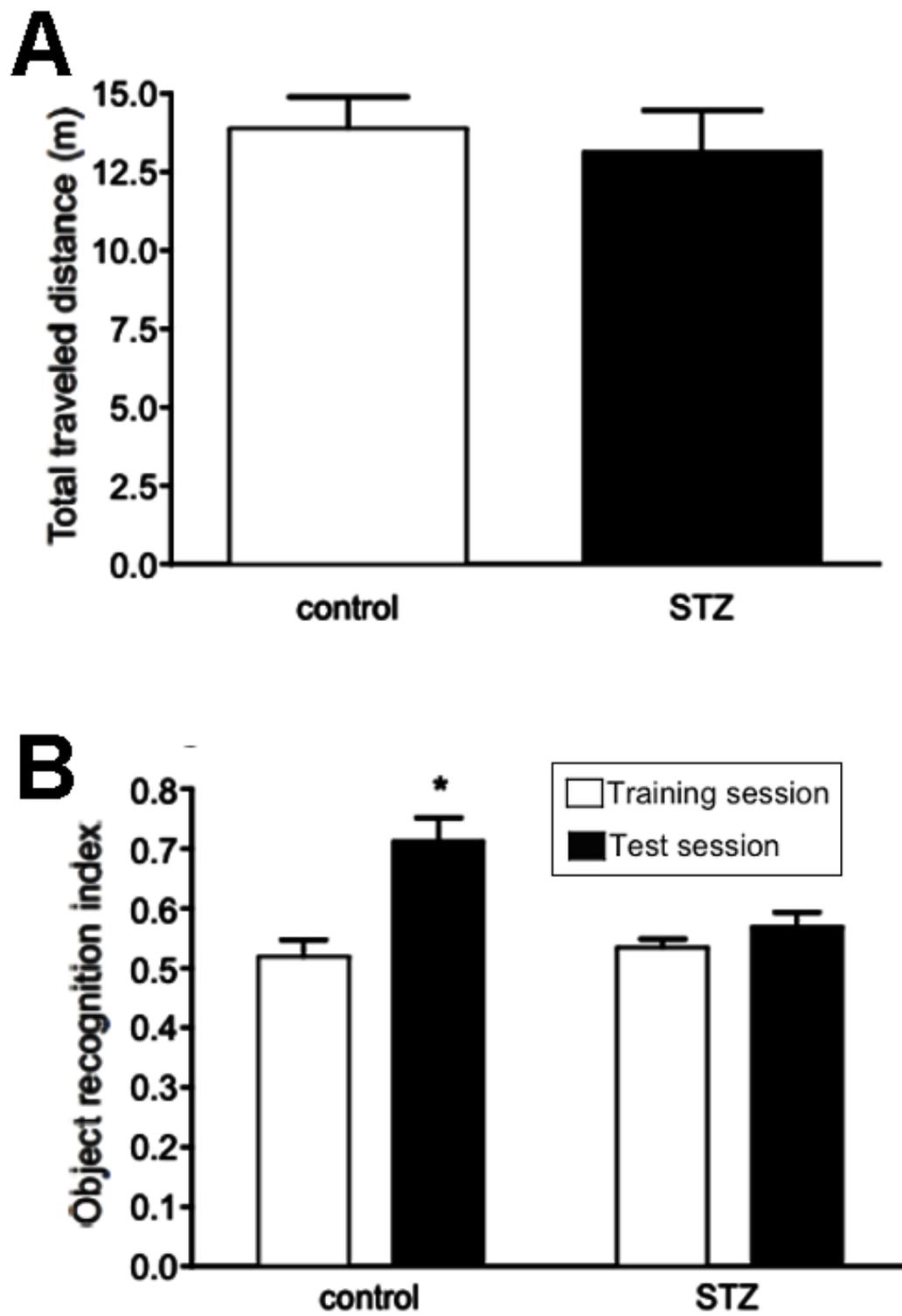
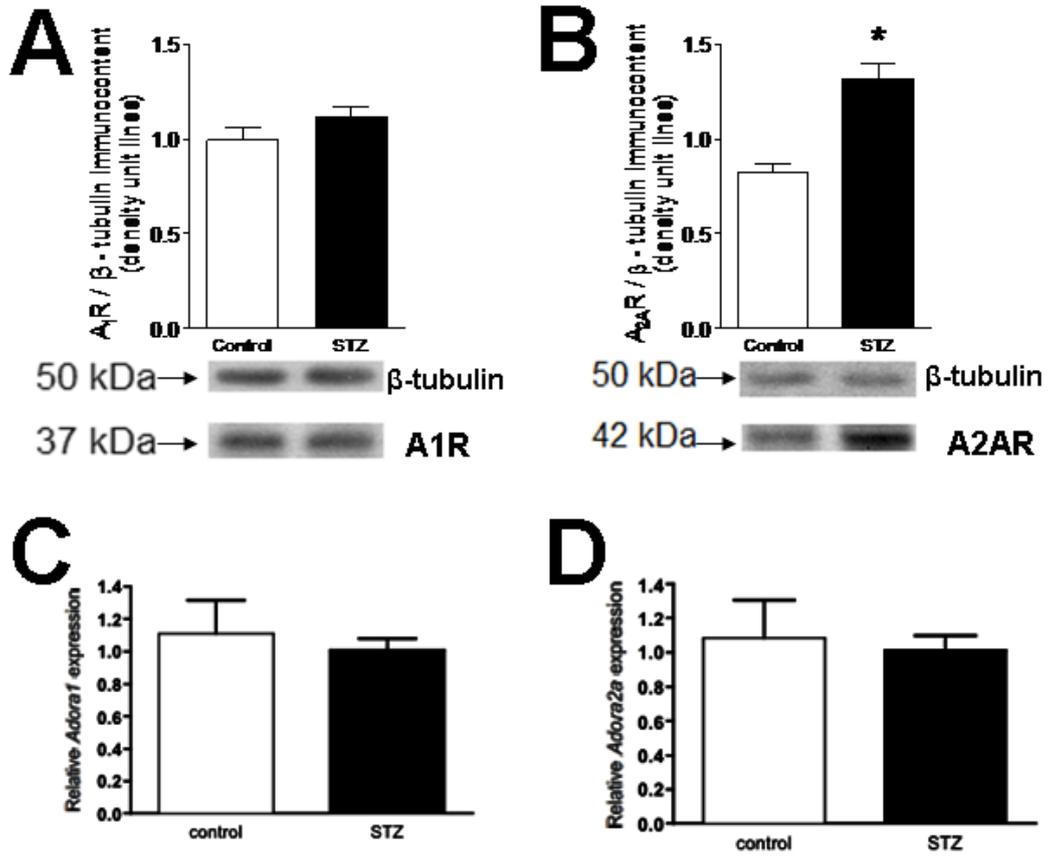


Figure 2



4.2. EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE A MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO

Previamente à tarefa de reconhecimento de objeto novo, o efeito dos tratamentos sobre a atividade locomotora foi avaliado no campo aberto. Não foi observada diferença significativa na distância total percorrida entre os grupos ($P = 0.4917$) (Figura 4).

A análise do tempo de exploração total dos objetos durante as sessões de treino e teste revelou efeito significativo das sessões [$F (1,38) = 9.14$, $P = 0.0045$] (Figura 5), indicando que os animais de todos os grupos apresentam menor tempo de exploração total na sessão de teste. O tempo de exploração do objeto familiar na sessão de teste também foi analisado, sendo apenas o efeito das sessões significativo [$F (1,38) = 37.65$, $P < 0.0001$] (Figura 6).

Na tarefa de reconhecimento de objetos houve significativa interação entre os tratamentos [$F (1,38) = 4.491$, $P = 0.041$] e a análise das medidas repetidas (índice treino x índice teste) revelou significativo efeito preventivo do tratamento com cafeína sobre comprometimento do desempenho na tarefa induzido por STZ [$F (1,38) = 46.195$, $P < 0.001$] (Figura 7).

Figura 4

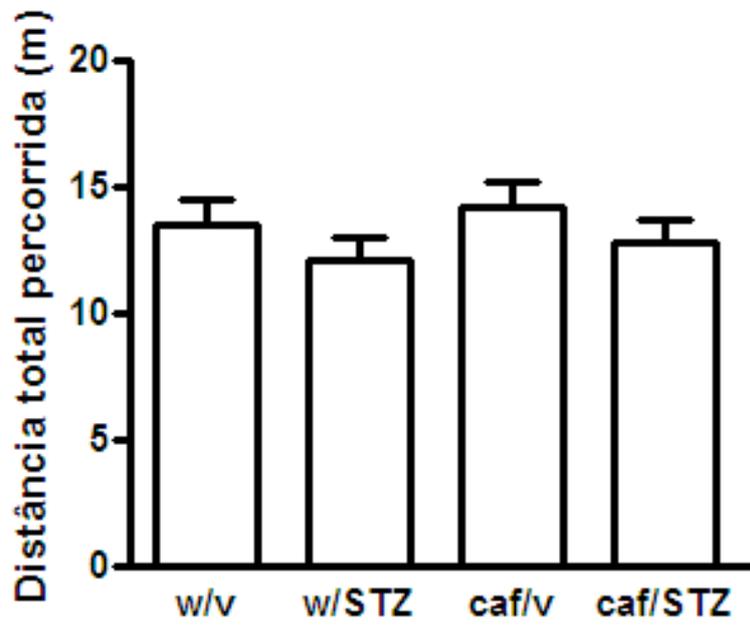


Figura 5

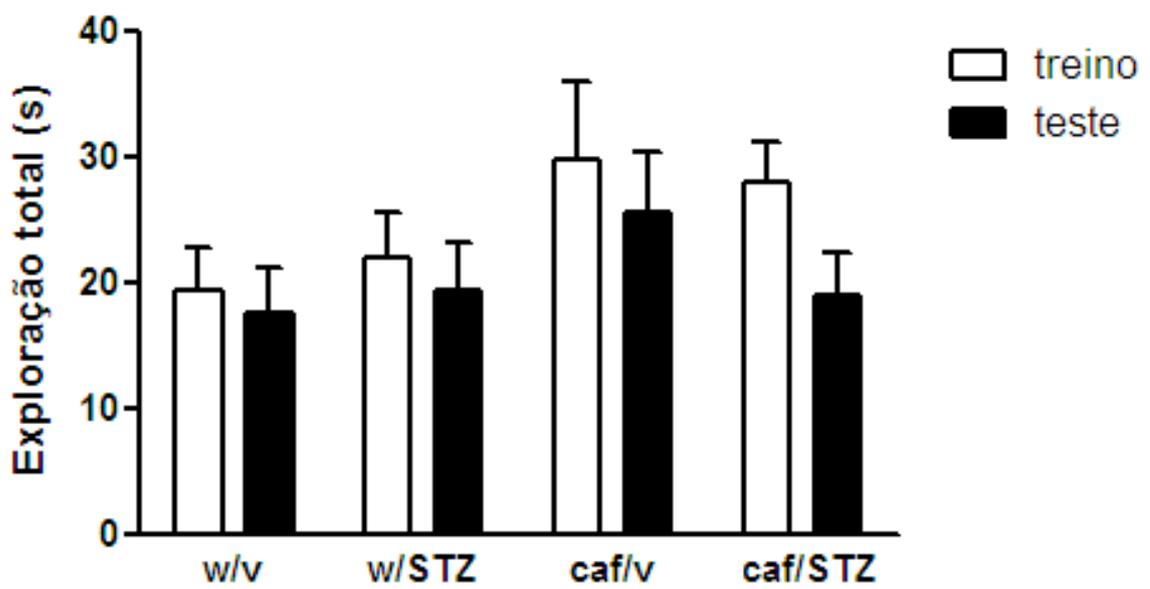


Figura 6

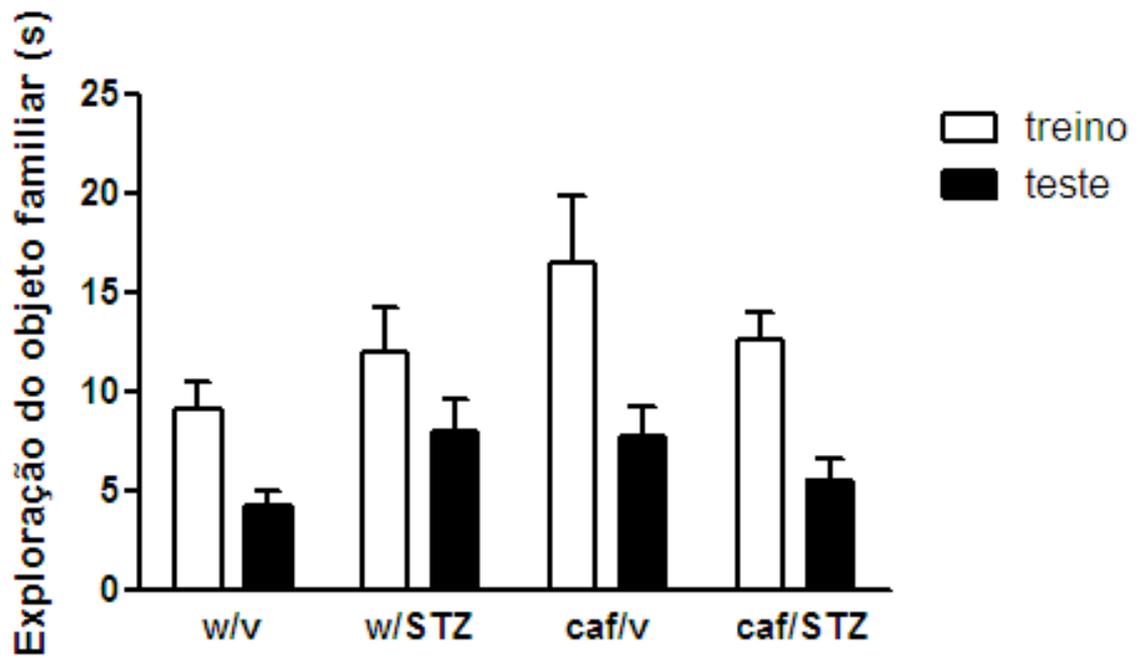
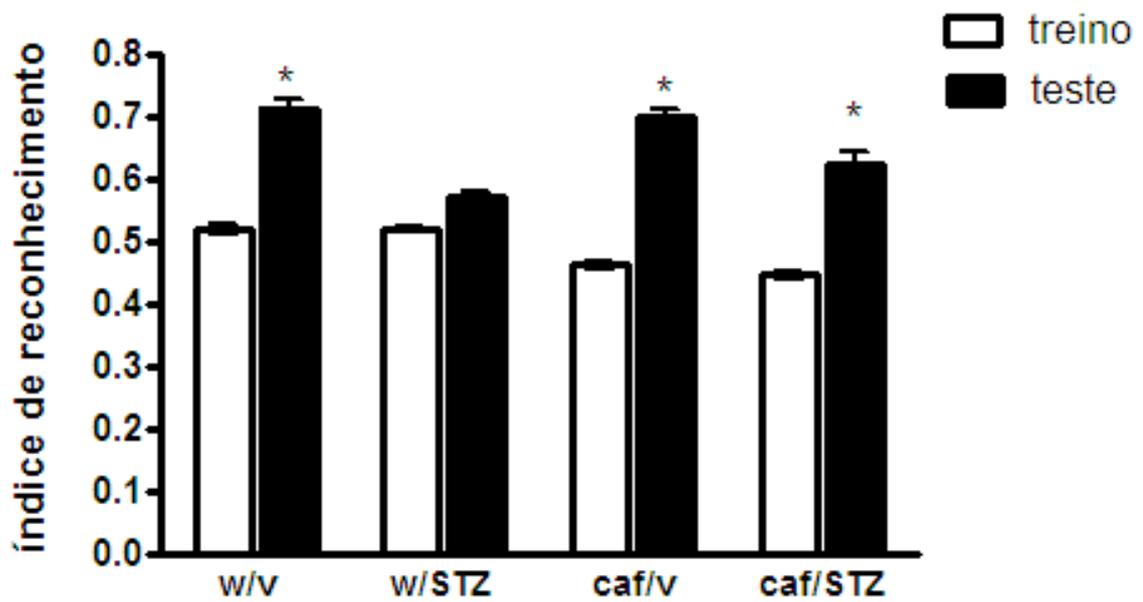


Figura 7



5. DISCUSSÃO

Considerando que sistemas modulatórios podem ser modificados sob condições patológicas e de declínio cognitivo, o objetivo deste trabalho foi elucidar o perfil dos receptores A_1 e A_{2A} no modelo de demência esporádica induzida por STZ e determinar uma possível eficácia da cafeína na prevenção do déficit mnemônico desse modelo.

A primeira parte desta dissertação de mestrado foi dedicada a determinar se a densidade e/ou expressão dos receptores A_1 e A_{2A} estão modificadas no modelo de demência esporádica induzida por STZ.

A infusão i.c.v. de STZ em ratos tem sido descrita como um modelo apropriado de DA do tipo esporádica, uma vez que apresenta progressiva deterioração da memória e os marcadores bioquímicos e morfológicos da DA (Lester-Coll et al., 2006; Salkovic-Petrisic et al., 2006). Neste estudo, os animais infundidos com STZ apresentaram comprometimento do desempenho da memória de curto prazo, de acordo com o já documentado papel da insulina no desempenho da memória (Zhao et al., 1999; de la Monte e Wands, 2005) e o comprometimento da sinalização insulínica observado na DA (de la Monte e Wands, 2005; Rivera et al, 2005; Steen et al., 2005). Ratos infundidos com STZ não apresentaram diferença significativa na distancia total percorrida na tarefa do campo aberto e, portanto, alterações na atividade locomotora não estão relacionadas ao déficit observado na tarefa de reconhecimento do objeto novo. Neste trabalho apenas a memória de curta duração foi testada, pois o desempenho nessa tarefa se deteriora à medida que o período de tempo entre as sessões de treino e teste aumenta (Sik et al., 2003) – embora alguns estudos tenham avaliado a memória de longo prazo nessa tarefa. Além disso,

marcante comprometimento da memória de curto prazo é um dos sintomas precoces da DA (Selkoe, 2001). A análise por Western blot dos receptores A_1 e A_{2A} no hipocampo total quatro semanas após a infusão i.c.v. de STZ revelou aumento do imunoconteúdo de A_{2A} , sem modificação significativa dos níveis de receptores A_1 na comparação com o grupo controle. Não foi encontrada modificação dos níveis do mRNA codificador para ambos os receptores e, portanto, o mecanismo por trás da modificação da densidade do A_{2A} hipocampal encontrada nesse estudo ainda permanece desconhecido. Este é o primeiro estudo a avaliar a densidade dos receptores de adenosina no hipocampo em modelo animal de demência esporádica. Os resultados aqui apresentados fornecem evidência direta de que a densidade dos receptores A_{2A} está modificada nesse modelo. Muitas evidências apontam para um papel dos receptores de adenosina em doenças neurológicas, uma vez que a sinalização pela adenosina tem papel chave na modulação fina das sinapses excitatórias. Assume-se que, em estado basal, a adenosina – atuando via receptores A_1 – mantém uma inibição tônica da transmissão excitatória e, sob altas frequências de disparo, uma facilitação tônica mediada pelos receptores A_{2A} . Em acordo com essa idéia, grande parte dos distúrbios neurológicos envolve, em algum ponto, excitotoxicidade resultante de estimulação excessiva do sistema excitatório (Lipton e Rosenberg, 1994) e evidências sugerem que sob condições de neurodegeneração o balanço entre os receptores A_1 e A_{2A} pode ser modificado, favorecendo os receptores facilitatórios A_{2A} . No entanto, consideravelmente poucos estudos têm sido dedicados à avaliação dos efeitos de estímulos nocivos de longo prazo sobre a densidade e eficiência dos receptores A_{2A} e a maioria deles têm como foco no estriado, que contém alta

densidade desses receptores. Curiosamente, a modificação dos receptores A_{2A} observada sob estímulos nocivos parece ser mais relevante em regiões extra-estriatais. Os receptores A_{2A} são pouco expressos no hipocampo de ratos saudáveis (Giménez-Llort et al., 2007; Rodrigues et al., 2008) e o aumento do imunoconteúdo de receptores A_{2A} encontrado neste trabalho está de acordo a maioria dos estudos dedicados à investigação de modificações desses receptores em áreas límbicas e córtex cerebral de modelos animais caracterizados por comprometimento cognitivo (revisado por Cunha e Agostinho, 2010).

Aumento da densidade dos receptores A_{2A} no hipocampo acompanhado de comprometimento da memória foi encontrado em condições como envelhecimento (Canas et al., 2009b), DM tipo I (Duarte et al., 2006) e estresse (Cunha et al., 2006). A habilidade da cafeína em prevenir o déficit de memória nesses modelos (Cunha et al., 2006; Costa et al., 2008a; Duarte et al., 2006; Cognato et al., 2010) e a observação de que esse efeito protetor é mimetizado por antagonistas seletivos dos receptores A_{2A} (Prediger et al., 2005; Cunha et al., 2006; Cognato et al., 2010) forneceu uma base conceitual para a investigação da possível eficácia da cafeína no modelo de demência induzida por STZ. Portanto, a segunda parte deste trabalho foi dedicada à determinação da possível eficácia da cafeína na prevenção do déficit de memória do modelo de demência induzida por STZ.

Ratos Wistar adultos machos foram tratados por duas semanas com água de beber ou cafeína (1 mg/mL) previamente à administração i.c.v. de STZ ou veículo. Após a infusão i.c.v, os animais foram submetidos a mais quatro

semanas de tratamento com água de beber ou cafeína. Ao final dos tratamentos, foi realizada a avaliação da atividade locomotora em um campo aberto e o teste de reconhecimento de objetos. O tratamento com cafeína preveniu o déficit de memória de reconhecimento do modelo de demência induzida por STZ, conforme indicado pelo índice de reconhecimento na tarefa de reconhecimento do objeto novo 90 minutos após o treino. Não foi observado efeito significativo do tratamento com cafeína sobre a atividade locomotora em nenhum dos grupos.

As hipóteses atuais sobre o mecanismo pelo qual o bloqueio dos A_{2A} confere neuroproteção versam sobre a habilidade desses receptores em controlar o grau de estimulação do sistema excitatório e os processos neuroinflamatórios, uma vez que ambos os eventos estão envolvidos na maioria dos processos de neurodegeneração (Lipton e Rosenberg, 1994). O mecanismo pelo qual a demência induzida por STZ leva a modificação do imunoconteúdo de A_{2A} encontrada neste estudo permanece desconhecida. A aparente discrepância entre os dados de Western blot e qPCR (i.e. aumento do imunoconteúdo de A_{2A} sem modificação da expressão do mRNA codificador desse receptor) sugere que no modelo de demência induzida por STZ a taxa de renovação do A_{2A} é mais afetada que a síntese desse receptor. É importante ressaltar que o aumento do imunoconteúdo de A_{2A} descrito neste estudo não discrimina proteínas intracelulares daquelas ligadas à membrana. Portanto, a modificação da densidade de A_{2A} no modelo de demência induzida por STZ ainda necessita ser investigada a nível funcional. Ainda, deve ser salientado que os ensaios de Western blot foram realizados após um período crônico de demência e a idéia de que a ativação dos receptores A_1 é mais

relevante na fase aguda da injúria encefálica (Sweeney, 1997) pode fornecer uma compreensão sobre o porquê neste estudo não foi encontrada modificação significativa do imunoconteúdo desse receptor no modelo de demência induzida por STZ. Entretanto, não foi testado se a ativação dos A_1 pode ocorrer nos estágios iniciais da demência nesse modelo. Em contrapartida, os receptores A_{2A} parecem ter um relevante papel em estágios mais avançados da lesão e sob condições nocivas crônicas, como em doenças neurodegenerativas (Pinna et al., 2002; Rebola et al., 2005). Essa observação está de acordo com o aumento do imunoconteúdo de A_{2A} encontrado neste estudo e, considerando que a STZ exerce seus efeitos por meio do comprometimento da sinalização encefálica da insulina, os resultados apresentados nesta dissertação sugerem que os receptores de adenosina podem ter um papel também nesse contexto. Além disso, o efeito neuroprotetor da cafeína sobre a memória no modelo de demência induzida por STZ sugere que o bloqueio dos receptores de adenosina pode ser uma estratégia eficaz em condições nas quais há alteração no metabolismo encefálico da insulina.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho o comprometimento de memória resultante da administração i.c.v. de STZ em ratos foi confirmado utilizando a tarefa de reconhecimento do objeto novo. Esse achado está de acordo com evidências prévias e legitima a utilização da infusão i.c.v. de STZ como um modelo de demência esporádica neste estudo.

Pela primeira vez, foram caracterizados o imunoconteúdo e a expressão dos receptores hipocampais de adenosina A_1 e A_{2A} em modelo animal de demência esporádica. O aumento do imunoconteúdo de A_{2A} encontrado neste trabalho está de acordo com estudos prévios em outros modelos caracterizados por comprometimento da memória, indicando, portanto, um papel desses receptores também no modelo de demência esporádica. Ainda, o aumento do imunoconteúdo de A_{2A} encontrado neste trabalho não está associado à modificação significativa da expressão do mRNA codificante desse receptor, indicando modificações de ordem pós-traducional.

Além disso, este é o primeiro estudo a demonstrar a habilidade da cafeína em prevenir o comprometimento da memória de reconhecimento no modelo de demência esporádica. Portanto, os dados apresentados neste trabalho corroboram o papel neuroprotetor do consumo crônico de cafeína e demonstram que a manipulação do sistema adenosinérgico é uma promissora estratégia neuroprotetora também sob condições de comprometimento da sinalização insulínica encefálica.

7. REFERÊNCIAS

- Agrawal R, Mishra B, Tyagi E, Nath C, Shukla R (2010) Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacol Res* 61:247-252.
- Albasanz JL, Perez S, Barrachina M, Ferrer I, Martin M (2008) Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 18:211-219
- Angelucci ME, Cesario C, Hiroi RH, Rosalen PL, Da Cunha C (2002) Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. *Braz J Med Biol Res* 35:1201-1208.
- Angulo E, Casado V, Mallol J, Canela EI, Vinals F, Ferrer I, Lluís C, Franco R (2003) A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol* 13:440-451.
- Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, Shippy D, Tan J (2006) Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* 142:941-952.
- Arendash GW, Mori T, Cao C, Mamcarz M, Runfeldt M, Dickson A, Rezai-Zadeh K, Tane J, Citron BA, Lin X, Echeverria V, Potter H (2009) Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. *J Alzheimers Dis* 17:661-680.
- Arnaud MJ, Bracco I, Welsch C (1982) Metabolism and distribution of labeled theophylline in the pregnant rat. Impairment of theophylline metabolism by pregnancy and absence of a blood-brain barrier in the fetus. *Pediatr Res* 16:167-171.

- Arnaud MJ (1987) The pharmacology of caffeine. *Prog Drug Res* 31:273-313.
- Beaumont M, Batejat D, Pierard C, Coste O, Doireau P, Van Beers P, Chauffard F, Chassard D, Enslin M, Denis JB, Lagarde D (2001) Slow release caffeine and prolonged (64-h) continuous wakefulness: effects on vigilance and cognitive performance. *J Sleep Res* 10:265-276.
- Bedoya FJ, Solano F, Lucas M (1996) N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia* 52:344-347.
- Behan WM, Stone TW (2002) Enhanced neuronal damage by co-administration of quinolinic acid and free radicals, and protection by adenosine A2A receptor antagonists. *Br J Pharmacol* 135:1435-1442.
- Benarroch EE (2008) Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology* 70:231-236.
- Berne RM, Rubio R (1974) Adenine nucleotide metabolism in the heart. *Circ Res* 35 Suppl 3:109-120.
- Bevins RA, Besheer J (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 1:1306-1311.
- Bichler A, Swenson A, Harris MA (2006) A combination of caffeine and taurine has no effect on short term memory but induces changes in heart rate and mean arterial blood pressure. *Amino Acids* 31:471-476.
- Bonan CD, Walz R, Pereira GS, Worm PV, Battastini AM, Cavalheiro EA, Izquierdo I, Sarkis JJ (2000) Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 39:229-238.

- Broch OJ, Ueland PM (1980) Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain. *J Neurochem* 35:484-488.
- Bonati M, Latini R, Galletti F, Young JF, Tognoni G, Garattini S (1982) Caffeine disposition after oral doses. *Clin Pharmacol Ther* 32:98-106.
- Brambilla D, Chapman D, Greene R (2005) Adenosine mediation of presynaptic feedback inhibition of glutamate release. *Neuron* 46:275-283.
- Brown P, Dale N (2002) Spike-independent release of ATP from *Xenopus* spinal neurons evoked by activation of glutamate receptors. *J Physiol* 540:851-860.
- Buckner RL (2004) Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate. *Neuron* 44:195-208.
- Canas PM, Porciuncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, Oliveira CR, Cunha RA (2009a) 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.
- Canas PM, Duarte JM, Rodrigues RJ, Kofalvi A, Cunha RA (2009b) Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus. *Neurobiol Aging* 30:1877-1884.
- Cao C, Cirrito JR, Lin X, Wang L, Verges DK, Dickson A, Mamcarz M, Zhang C, Mori T, Arendash GW, Holtzman DM, Potter H (2009) Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of Alzheimer's disease transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 17:681-697.
- Chen JF, Huang Z, Ma J, Zhu J, Moratalla R, Standaert D, Moskowitz MA, Fink JS, Schwarzschild MA (1999) A(2A) adenosine receptor deficiency

attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J Neurosci* 19:9192-9200.

Childs E, de Wit H (2006) Subjective, behavioral, and physiological effects of acute caffeine in light, nondependent caffeine users. *Psychopharmacology (Berl)* 185:514-523.

Chimon S, Shaibat MA, Jones CR, Calero DC, Aizezi B, Ishii Y (2007) Evidence of fibril-like beta-sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's beta-amyloid. *Nat Struct Mol Biol*.

Clark RE, Zola SM, Squire LR (2000) Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 20:8853-8860.

Cognato GP, Agostinho PM, Hockemeyer J, Muller CE, Souza DO, Cunha RA (2010) Caffeine and an adenosine A(2A) receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. *J Neurochem* 112:453-462.

Corder EH, Lannfelt L, Basun H (1996) Apolipoprotein E genotype and the rate of decline in probable Alzheimer disease. *Arch Neurol* 53:1094-1095.

Corodimas KP, Pruitt JC, Stieg JM (2000) Acute exposure to caffeine selectively disrupts context conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 152:376-382.

Corodimas KP, Tomita H (2001) Adenosine A1 receptor activation selectively impairs the acquisition of contextual fear conditioning in rats. *Behav Neurosci* 115:1283-1290.

Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Souza DO, Porciuncula LO (2008a) Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience* 153:1071-1078.

Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Ardais AP, Moreira JD, Souza DO, Porciuncula LO (2008b) 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

Craft S, Dagogo-Jack SE, Wiethop BV, Murphy C, Nevins RT, Fleischman S, Rice V, Newcomer JW, Cryer PE (1993) Effects of hyperglycemia on memory and hormone levels in dementia of the Alzheimer type: a longitudinal study. *Behav Neurosci* 107:926-940.

Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, Cherrier M, Lofgreen C, Latendresse S, Petrova A, Plymate S, Raskind M, Grimwood K, Veith RC (1999) Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Arch Gen Psychiatry* 56:1135-1140.

Cunha GM, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA (2006) Increased density and synapto-protective effect of adenosine A2A receptors upon sub-chronic restraint stress. *Neuroscience* 141:1775-1781.

Cunha RA (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38:107-125.

Cunha RA, Ferre S, Vaugeois JM, Chen JF (2008) Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. *Curr Pharm Des* 14:1512-1524.

Cunha RA, Agostinho PM (2010) Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 1:S95-116.

Dall'Igna OP, Porciuncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR (2003) Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol* 138:1207-1209.

- Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR (2007) Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol* 203:241-245.
- de la Monte SM, Wands JR (2005) Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 7:45-61.
- Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC (1995) Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol* 50:2015-2020.
- de Mendonca A, Ribeiro JA (1994) Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience* 62:385-390.
- de Mendonca A, Sebastiao AM, Ribeiro JA (1995) Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation. *Neuroreport* 6:1097-1100.
- de Mendonca A, Sebastiao AM, Ribeiro JA (2000) Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev* 33:258-274.
- Devoe LD, Murray C, Youssif A, Arnaud M (1993) Maternal caffeine consumption and fetal behavior in normal third-trimester pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 168:1105-1111; discussion 1111-1102.
- Dews PB, Curtis GL, Hanford KJ, O'Brien CP (1999) The frequency of caffeine withdrawal in a population-based survey and in a controlled, blinded pilot experiment. *J Clin Pharmacol* 39:1221-1232.
- Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68:213-237.

- Duarte JM, Oliveira CR, Ambrosio AF, Cunha RA (2006) Modification of adenosine A1 and A2A receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochem Int* 48:144-150.
- Duelli R, Schrock H, Kuschinsky W, Hoyer S (1994) Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci* 12:737-743.
- Dunwiddie TV, Hoffer BJ (1980) Adenine nucleotides and synaptic transmission in the in vitro rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 69:59-68.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.
- Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C (2007) The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* 30:123-152.
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59.
- Eskelinen MH, Kivipelto M (2010) Caffeine as a protective factor in dementia and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 1:S167-174.
- Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K (1997) Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 20:482-487.
- Ferrer I, Barrachina M, Puig B (2002) Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol* 104:583-591.
- Flagmeyer I, Haas HL, Stevens DR (1997) Adenosine A1 receptor-mediated depression of corticostriatal and thalamostriatal glutamatergic synaptic potentials in vitro. *Brain Res* 778:178-185.

- Fontella FU, Bruno AN, Crema LM, Battastini AM, Sarkis JJ, Netto CA, Dalmaz C (2004) Acute and chronic stress alter ecto-nucleotidase activities in synaptosomes from the rat hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 78:341-347.
- Fredholm BB, Hedqvist P (1980) Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides. *Biochem Pharmacol* 29:1635-1643.
- Fredholm BB (1997) Adenosine and neuroprotection. *Int Rev Neurobiol* 40:259-280.
- Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51:83-133.
- Fredholm BB, Cunha RA, Svenningsson P (2003) Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr Top Med Chem* 3:413-426.
- Frolich L, Dirr A, Gotz ME, Gsell W, Reichmann H, Riederer P, Maurer K (1998) Acetylcholine in human CSF: methodological considerations and levels in dementia of Alzheimer type. *J Neural Transm* 105:961-973.
- Gao Y, Phillis JW (1994) CGS 15943, an adenosine A2 receptor antagonist, reduces cerebral ischemic injury in the Mongolian gerbil. *Life Sci* 55:PL61-65.
- Geula C, Mesulam MM (1989) Cortical cholinergic fibers in aging and Alzheimer's disease: a morphometric study. *Neuroscience* 33:469-481.
- Gilliland K, Bullock W (1983) Caffeine: a potential drug of abuse. *Adv Alcohol Subst Abuse* 3:53-73.
- Gimenez-Llort L, Schiffmann SN, Shmidt T, Canela L, Camon L, Wassholm M, Canals M, Terasmaa A, Fernandez-Teruel A, Tobena A, Popova E, Ferre S, Agnati L, Ciruela F, Martinez E, Scheel-Kruger J, Lluís C, Franco R, Fuxe K, Bader M (2007) Working memory deficits in transgenic rats

overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain. *Neurobiol Learn Mem* 87:42-56.

Ginsborg BL, Hirst GD (1972) The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J Physiol* 224:629-645.

Golembiowska K, Zylewska A (1997) Adenosine receptors--the role in modulation of dopamine and glutamate release in the rat striatum. *Pol J Pharmacol* 49:317-322.

Greene RW, Haas HL (1991) The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 36:329-341.

Gui L, Duan W, Tian H, Li C, Zhu J, Chen JF, Zheng J (2009) Adenosine A_{2A} receptor deficiency reduces striatal glutamate outflow and attenuates brain injury induced by transient focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 1297:185-193.

Hameleers PA, Van Boxtel MP, Hogervorst E, Riedel WJ, Houx PJ, Buntinx F, Jolles J (2000) Habitual caffeine consumption and its relation to memory, attention, planning capacity and psychomotor performance across multiple age groups. *Hum Psychopharmacol* 15:573-581.

Hammond RS, Tull LE, Stackman RW (2004) On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 82:26-34.

Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.

Harms HH, Wardeh G, Mulder AH (1978) Adenosine modulates depolarization-induced release of 3H-noradrenaline from slices of rat brain neocortex. *Eur J Pharmacol* 49:305-308.

- Haskell CF, Kennedy DO, Wesnes KA, Scholey AB (2005) Cognitive and mood improvements of caffeine in habitual consumers and habitual non-consumers of caffeine. *Psychopharmacology (Berl)* 179:813-825.
- Heatherley SV, Hayward RC, Seers HE, Rogers PJ (2005) Cognitive and psychomotor performance, mood, and pressor effects of caffeine after 4, 6 and 8 h caffeine abstinence. *Psychopharmacology (Berl)* 178:461-470.
- Herholz K, Salmon E, Perani D, Baron JC, Holthoff V, Frolich L, Schonknecht P, Ito K, Mielke R, Kalbe E, Zundorf G, Delbeuck X, Pelati O, Anchisi D, Fazio F, Kerrouche N, Desgranges B, Eustache F, Beuthien-Baumann B, Menzel C, Schroder J, Kato T, Arahata Y, Henze M, Heiss WD (2002) Discrimination between Alzheimer dementia and controls by automated analysis of multicenter FDG PET. *Neuroimage* 17:302-316.
- Hogervorst E, Bandelow S, Schmitt J, Jentjens R, Oliveira M, Allgrove J, Carter T, Gleeson M (2008) Caffeine improves physical and cognitive performance during exhaustive exercise. *Med Sci Sports Exerc* 40:1841-1851.
- Hung AY, Koo EH, Haass C, Selkoe DJ (1992) Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9439-9443.
- Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, Ahmad AS, Islam F (2006) Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav Brain Res* 171:9-16.
- Jarvis MJ (1993) Does caffeine intake enhance absolute levels of cognitive performance? *Psychopharmacology (Berl)* 110:45-52.
- Katzung BG (2004) *Basic & clinical pharmacology*. New York: Lange Medical Books/McGraw Hill.

- Kopf SR, Melani A, Pedata F, Pepeu G (1999) Adenosine and memory storage: effect of A(1) and A(2) receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 146:214-219.
- Kroncke KD, Fehsel K, Sommer A, Rodriguez ML, Kolb-Bachofen V (1995) Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376:179-185.
- Kuusisto J, Koivisto K, Mykkanen L, Helkala EL, Vanhanen M, Hanninen T, Kervinen K, Kesaniemi YA, Riekkinen PJ, Laakso M (1997) Association between features of the insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease independently of apolipoprotein E4 phenotype: cross sectional population based study. *BMJ* 315:1045-1049.
- Lachance MP, Marlowe C, Waddell WJ (1983) Autoradiographic disposition of [1-methyl-¹⁴C]- and [2-¹⁴C]caffeine in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 71:237-241.
- Lannert H, Hoyer S (1998) Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci* 112:1199-1208.
- Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79:463-484.
- Lee HT, Gallos G, Nasr SH, Emala CW (2004) A1 adenosine receptor activation inhibits inflammation, necrosis, and apoptosis after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 15:102-111.
- Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O'Brien PC, Palumbo PJ (1997) Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol* 145:301-308.

- Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM (2006) Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9:13-33.
- Lieberman HR, Tharion WJ, Shukitt-Hale B, Speckman KL, Tulley R (2002) Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training. *Sea-Air-Land. Psychopharmacology (Berl)* 164:250-261.
- Linden J (2001) Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:775-787.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-622.
- Liu GJ, Bennett MR (2003) ATP secretion from nerve trunks and Schwann cells mediated by glutamate. *Neuroreport* 14:2079-2083.
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.
- Maemoto T, Tada M, Mihara T, Ueyama N, Matsuoka H, Harada K, Yamaji T, Shirakawa K, Kuroda S, Akahane A, Iwashita A, Matsuoka N, Mutoh S (2004) Pharmacological characterization of FR194921, a new potent, selective, and orally active antagonist for central adenosine A1 receptors. *J Pharmacol Sci* 96:42-52.
- Maia L, de Mendonca A (2002) Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol* 9:377-382.
- Man HY, Lin JW, Ju WH, Ahmadian G, Liu L, Becker LE, Sheng M, Wang YT (2000) Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25:649-662.
- Margolis RU, Altszuler N (1967) Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature* 215:1375-1376.

- Mayer G, Nitsch R, Hoyer S (1990) Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res* 532:95-100.
- Monopoli A, Lozza G, Forlani A, Mattavelli A, Ongini E (1998) Blockade of adenosine A2A receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effects in cerebral ischaemia in rats. *Neuroreport* 9:3955-3959.
- Morgan KJ, Stults VJ, Zabik ME (1982) Amount and dietary sources of caffeine and saccharin intake by individuals ages 5 to 18 years. *Regul Toxicol Pharmacol* 2:296-307.
- Neugroschl J, Sano M (2009) An update on treatment and prevention strategies for Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9:368-376.
- Nitsch R, Hoyer S (1991) Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neurosci Lett* 128:199-202.
- Normile HJ, Barraco RA (1991) N6-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A1 receptors. *Brain Res Bull* 27:101-104.
- Okada M, Mizuno K, Kaneko S (1996) Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neurosci Lett* 212:53-56.
- Ongini E, Adami M, Ferri C, Bertorelli R (1997) Adenosine A2A receptors and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 825:30-48.
- Ott BR, Lafleche G, Whelihan WM, Buongiorno GW, Albert MS, Fogel BS (1996) Impaired awareness of deficits in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 10:68-76.
- Patat A, Rosenzweig P, Enslin M, Trocherie S, Miget N, Bozon MC, Allain H, Gandon JM (2000) Effects of a new slow release formulation of caffeine

- on EEG, psychomotor and cognitive functions in sleep-deprived subjects. *Hum Psychopharmacol* 15:153-170.
- Pedata F, Corsi C, Melani A, Bordoni F, Latini S (2001) Adenosine extracellular brain concentrations and role of A2A receptors in ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 939:74-84.
- Perez JL, Carrero I, Gonzalo P, Arevalo-Serrano J, Sanz-Anquela JM, Ortega J, Rodriguez M, Gonzalo-Ruiz A (2010) Soluble oligomeric forms of beta-amyloid (A β) peptide stimulate A β production via astrogliosis in the rat brain. *Exp Neurol* 223:410-421.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS (2003) GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423:435-439.
- Pinna A, Corsi C, Carta AR, Valentini V, Pedata F, Morelli M (2002) Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A(2A) receptor mRNA by dopamine denervation. *Eur J Pharmacol* 446:75-82.
- Plaschke K, Hoyer S (1993) Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 11:477-483.
- Popoli P, Frank C, Tebano MT, Potenza RL, Pintor A, Domenici MR, Nazzicone V, Pezzola A, Reggio R (2003) Modulation of glutamate release and excitotoxicity by adenosine A2A receptors. *Neurology* 61:S69-71.
- Prediger RD, Batista LC, Takahashi RN (2005) Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol Aging* 26:957-964.
- Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR (1998) Alzheimer disease--when and why? *Nat Genet* 19:314-316.

- Prickaerts J, Fahrig T, Blokland A (1999) Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. *Behav Brain Res* 102:73-88.
- Pull I, McIlwain H (1972) Metabolism of (^{14}C)adenine and derivatives by cerebral tissues, superfused and electrically stimulated. *Biochem J* 126:965-973.
- Rebola N, Porciuncula LO, Lopes LV, Oliveira CR, Soares-da-Silva P, Cunha RA (2005) Long-term effect of convulsive behavior on the density of adenosine A1 and A2A receptors in the rat cerebral cortex. *Epilepsia* 46 Suppl 5:159-165.
- Rees K, Allen D, Lader M (1999) The influences of age and caffeine on psychomotor and cognitive function. *Psychopharmacology (Berl)* 145:181-188
- Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A (2002) Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol* 68:377-392.
- Ribeiro JA, Sebastiao AM (2010) Modulation and metamodulation of synapses by adenosine. *Acta Physiol (Oxf)* 199:161-169.
- Ritchie K, Lovestone S (2002) The dementias. *Lancet* 360:1759-1766.
- Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM (2005) Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis* 8:247-268.
- Rodrigues RJ, Canas PM, Lopes LV, Oliveira CR, Cunha RA (2008) Modification of adenosine modulation of acetylcholine release in the hippocampus of aged rats. *Neurobiol Aging* 29:1597-1601.

- Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, Kimura N, Cole G, Schubert D, Oltersdorf T, Schenk DB (1989) Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 58:615-622.
- Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P (2006) Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J Neurochem* 96:1005-1015.
- Santos AR, Duarte CB (2008) Validation of internal control genes for expression studies: effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 86:3684-3692.
- Santos MS, Pereira EM, Carvahó AP (1999) Stimulation of immunoreactive insulin release by glucose in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 24:33-36.
- Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferre S (2007) Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol* 83:277-292.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101-1108.
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB (1994) STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 43:1326-1333.
- Schubert P, Reddington M, Kreutzberg GW (1979) On the possible role of adenosine as a modulatory messenger in the hippocampus and other regions of the CNS. *Prog Brain Res* 51:149-165.
- Schubert P, Rudolphi K (1998) Interfering with the pathologic activation of microglial cells and astrocytes in dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12 Suppl 2:S21-28.

- Schulingkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB (2000) Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 24:855-872.
- Schwarzschild MA, Chen JF, Ascherio A (2002) Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD. *Neurology* 58:1154-1160.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741-766.
- Selkoe DJ (2008) Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192:106-113.
- Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M (2007) Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology* 52:836-843.
- Siegelbaum SA, Kandel ER (1991) Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 1:113-120.
- Sik A, van Nieuwehuyzen P, Prickaerts J, Blokland A (2003) Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behav Brain Res* 147:49-54.
- Skeberdis VA, Lan J, Zheng X, Zukin RS, Bennett MV (2001) Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3561-3566.
- Squire LR, Wixted JT, Clark RE (2007) Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci* 8:872-883.

- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* 7:63-80.
- Stone TW (1985) *Purines: Pharmacology and Physiological Roles*. MacMillan, London
- Storey E, Spurck T, Pickett-Heaps J, Beyreuther K, Masters CL (1996) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not activity motile portions of neurites. *Brain Res* 735:59-66.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1977-1981.
- Sweeney MI (1997) Neuroprotective effects of adenosine in cerebral ischemia: window of opportunity. *Neurosci Biobehav Rev* 21:207-217.
- Tanaka H, Nakazawa K, Arima M, Iwasaki S (1984) Caffeine and its dimethylxanthines and fetal cerebral development in rat. *Brain Dev* 6:355-361.
- Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615-29619.
- Tiraboschi P, Hansen LA, Masliah E, Alford M, Thal LJ, Corey-Bloom J (2004) Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology* 62:1977-1983.
- Tomiya M, Kimura T, Maeda T, Tanaka H, Kannari K, Baba M (2004) Upregulation of striatal adenosine A2A receptor mRNA in 6-hydroxydopamine-lesioned rats intermittently treated with L-DOPA. *Synapse* 52:218-222.

- Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML (1993) Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 197:1458-1464.
- Unger JW, Livingston JN, Moss AM (1991) Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog Neurobiol* 36:343-362.
- Von Lubitz DK, Lin RC, Bischofberger N, Beenhakker M, Boyd M, Lipartowska R, Jacobson KA (1999) Protection against ischemic damage by adenosine amine congener, a potent and selective adenosine A1 receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 369:313-317.
- Von Lubitz DK, Lin RC, Jacobson KA (1995) Cerebral ischemia in gerbils: effects of acute and chronic treatment with adenosine A2A receptor agonist and antagonist. *Eur J Pharmacol* 287:295-302.
- Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Braunton J, Lu WY, Becker LE, MacDonald JF, Wang YT (1997) Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* 388:686-690.
- Wang JH, Ma YY, van den Buuse M (2006) Improved spatial recognition memory in mice lacking adenosine A2A receptors. *Exp Neurol* 199:438-445.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181-193.
- Williams M (1989) Adenosine: The prototypic neuromodulator. *Neurochem Int* 14:249-264.
- Wood PL, Kim HS, Boyar WC, Hutchison A (1989) Inhibition of nigrostriatal release of dopamine in the rat by adenosine receptor agonists: A1 receptor mediation. *Neuropharmacology* 28:21-25.

Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ (1997) Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells. *J Neurosci* 17:1004-1010.

Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, Alkon DL (1999) Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem* 274:34893-34902.