

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**SISTEMA ADENOSINÉRGICO EM DIFERENTES  
PARADIGMAS COMPORTAMENTAIS**

GRACE SCHENATTO PEREIRA

Orientador:

Prof. Dr. IVÁN IZQUIERDO

Co-orientador:

Prof. Dr. JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica,  
como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre

2005

## AGRADECIMENTOS

Minha trajetória na bioquímica começou há aproximadamente oito anos. Durante esse tempo cresci como pessoa e como profissional. Fiz grandes amigos, ri, chorei, brinquei, briguei e fui muito feliz. Portanto, é necessário agradecer muitas pessoas que contribuíram e participaram da minha vida durante este período:

### *Aos meus exemplos de cientistas*

Ao Mestre **Ivan Izquierdo**, pela oportunidade única de trabalhar com ele. Obrigada pela confiança, pelas palavras de incentivo, pela amizade e principalmente pelo exemplo de cientista!

Ao **Sarkis**, quer dizer Professor Sarkis, por ter participado integralmente destes oito anos, como professor, orientador, conselheiro e principalmente amigo.

À **Carlinha**, meu anjo da guarda. Amo o que eu faço e esse amor deve-se em grande parte à presença da Carla na minha vida. Minha maior sorte foi quando entrei no laboratório 22 e fui designada a ajudá-la no seu doutorado. E não parou por aí, tive a honra de ser a primeira orientada da Carla e no doutorado, mesmo que extra oficialmente, continuei sendo orientada por ela. Sem falar no âmbito pessoal. Pra mim ela é a irmã que eu não tenho! Carla, muito, mas muito obrigada mesmo!

Ao **Martín Cammarota** muito obrigada por tudo que me ensinaste: farmacologia, bioquímica, inglês, espanhol. Obrigada pelas discussões sobre ciência durante o cafezinho diário. Obrigada pelos conselhos profissionais e pessoais. Enfim, muito obrigada pela confiança, paciência e disponibilidade. Queria que tu soubesses (não estou puxando o teu saco!) que eu te admiro muito como profissional e pessoa, que pra mim tu é um exemplo a ser seguido por todos aqueles que querem fazer ciência bem feita, coerente e inteligente.

### *Ao Centro de Memória*

À **Lia** pelos conselhos sempre vindos nas horas certas. Muito obrigada pela paciência e amizade.

À **Jú** minha linda, obrigada por ser uma amiga maravilhosa! Começamos juntas neste doutorado e conviver contigo foi essencial para o meu crescimento, tu nem imagina o quanto. Admiro de mais a tua força e determinação!

À **Janine** querida, que graças ao destino veio parar no laboratório! Parceira de experimentos, discussão de protocolos e resultados. Amiga das horas boas e ruins. Muito obrigada principalmente por ter contribuído com o teu conhecimento em boa parte desta tese!

À **Cris Furini**, minha querida ex-aluna que veio parar em Porto Alegre para minha felicidade e a do laboratório 11. Muito obrigada pela ajuda nos experimentos, pelos ratos operados fora de programação e pela tua amizade e confiança.

Ao **Weber**, pelas conversas altamente científicas e também pelas nem tanto. Obrigada pelos elogios nas horas mais tristes e desesperadoras.

Ao **Cristiano**, nosso médico, eletricitista, programador, analista de sistemas, estatístico, torneiro-mecânico, marceneiro, enfim o nosso faz tudo efficientíssimo. Obrigada pelas incontáveis ajudas, conversas e amizade.

Aos demais colegas do laboratório: **Dani, Olavo, Geléia, Charles, Júlia, Alessandra, Luiz, Cássio, Eduardo, Pablo, Bruno, Tiago, Ana Flávia.**

*Ao Laboratório de Enzimologia*

À **Ana** pelas conversas e conselhos.

A todos os colegas do laboratório 22 e 24, **Márcia, Alessandra B., Jean, Emerson, Elisandra, Alessandra T., Rô, Tiana, Daniela, Rafa e Sandra** pela amizade.

Um agradecimento especial para a **Vanessinha**. Essa guria é tudo de bom, faz a gente sorrir mesmo diante da maior desgraça. Obrigada Vanvis pela tua amizade!

*Ao Departamento de Bioquímica*

A todos os **professores** e **funcionários** que de uma maneira ou outra me auxiliaram durante o período da realização deste trabalho

As meninas das secretarias, **Cléia, Isabel, Mariana** pela ajuda burocrática e pela amizade.

Ao seu **Valdemar** pela sua disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

Ao **Valeri** e a todo o **peçoal do Ratário** cujo trabalho foi essencial pra realização desta tese.

À **UNIVATES**

Obrigada à **instituição** por ter me proporcionado a oportunidade de aprender e ensinar bioquímica, escrever projetos e orientar alunos de iniciação científica.

Ao meu anjo da guarda **Afonso**, que muito mais que um aluno é meu segundo irmão. Muito obrigada pela força nos momentos difíceis, pela confiança, pelos inúmeros favores, pela amizade incondicional.

À **Milena** e a **Kátia**, minhas cobaias, minhas queridas orientadas. Obrigada pela confiança, paciência e amizade.

Ao **Eduardo** pela amizade e parceria na pesquisa.

À **Ionara** pelo exemplo de profissional, amizade e parceria na pesquisa científica.

Às minhas queridas colegas de trabalho **Luciana, Graziela e Iraci**.

À **Eneida** pelas conversas essenciais nos momentos alegres e tristes.

Ao **Carlitos e galera da Van**. Obrigada pela convivência, conselhos, risadas e sessões gratuitas de terapia.

Aos meus **queridos alunos** que contribuíram para a minha formação docente.

*Aos meus amigos*

Ao **Júnior**, amigão do peito. Obrigada pelos conselhos, conversas e almoços. Muito obrigada pelo carinho e por tua amizade.

Ao **Ricardo** pelo carinho e pelas conversas sempre proveitosas.

Aos meus queridos amigos do **Vocal Teto Lírico** que neste último ano encheram a minha vida de alegria e música!

*Às minhas melhores amigas*

À **Cris** minha amigona do peito. Não tenho nem palavras pra dizer o quanto tu é importante na minha vida. Tenho uma imensa gratidão e admiração por ti. Ter te conhecido foi uma das melhores coisas que já aconteceram na minha vida. Quero ter tua amizade pra sempre.

À **Tati** minha parceira de tantos anos. São sete anos de convivência. Muito a gente riu e chorou juntas. Eu te amo amiga! Obrigada por tudo o que tu faz e tenho certeza que ainda fará por mim.

Á **Bá**, minha amada. Obrigada pela tua amizade sincera. Espero poder contar contigo pra sempre, até quando a gente estiver bem velhinha.

À **Márcia**, minha eterna amiga. Desde os dois anos de idade acompanhamos uma a vida da outra. Foram tantos momentos, tantas brigas e reconciliações! Muito obrigada pela tua amizade, te adoro!

*Aos meus tesouros*

**Mãe** querida, eu te amo demais! Ser tua filha é uma benção! Só sou o que sou porque tu foste e é uma mãe maravilhosa.

**Pai** querido, também te amo de mais! Obrigada pelo teu amor e pelos teus conselhos.

**Mano**, querido, tu és muito importante pra mim. Queria que tu soubesses que eu te amo muito e que sempre, sempre estarei do teu lado, assim como sei que tu sempre estarás do meu!

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	III
<b>Índice de figuras</b> .....	V
<b>Índice de tabelas</b> .....	VI
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	VII
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Conceitos básicos de memória .....	1
1.2. Bases celulares e moleculares da memória.....	3
1.3. Localização das memórias declarativas no neocórtex.....	5
1.4. Tipos de aprendizagem e tarefas comportamentais.....	9
1.4.1. Aprendizado não-associativo.....	10
1.4.1.1. Campo Aberto ou Open Field.....	11
1.4.2. Aprendizado associativo.....	12
1.4.2.1. Esquiva Inibitória.....	13
1.4.3. Atividade exploratória e memória em labirintos .....	14
1.4.3.1. Labirinto em cruz elevado .....	15
1.4.3.2. Labirinto aquático de Morris .....	16
1.5. Sistema adenosinérgico.....	17
1.5.1. Adenosina, dopamina e neurofisiopatologias .....	23
1.6. Objetivos.....	26

## 2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

<b>2.1. CAPÍTULO I - PEREIRA, G.S.; ROSSATO, J.I.; SARKIS, J.J.F.; CAMMAROTA, M.P.; BONAN, C.D.; IZQUIERDO, I. Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex impairs memory retrieval in the rat. Aceito para publicação na <b>Neurobiology of Learning and Memory</b>, 2005.....</b>	<b>27</b>
---	-----------

<b>2.2. CAPÍTULO II - PEREIRA, G.S.;</b> da SILVA, R.S.; SARKIS, J.J.F.; CAMMAROTA, M.P.; BONAN, C.D.; IZQUIERDO, I. Adenosine A <sub>1</sub> receptors from posterior cingulate cortex of rats are necessary for habituation to a novel environment. Submetido à revista <b>Neuroscience Letters</b> , 2005.....	35
<b>2.3. CAPÍTULO III - PEREIRA, G.S.;</b> ROSSATO, J.I.; FURINI, C.; FÜRSTENAU, C.R.; SARKIS, J.J.F.; BONAN, C.D.; CAMMAROTA, M.P.; IZQUIERDO, I. Caffeine and haloperidol interactions in distinct behavioral paradigms. Em preparação para submissão.....	51
<b>3. DISCUSSÃO</b> .....	75
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	83
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	84
<b>6. ANEXOS</b> .....	99

## RESUMO

A memória pode ser definida como o armazenamento e a evocação de uma informação aprendida. Existem diferentes tipos de memória que são por sua vez armazenadas em diferentes regiões cerebrais. É possível acessar estas memórias em animais utilizando diferentes paradigmas comportamentais. O processamento da memória requer a ativação de diversos sistemas para que a informação adquirida seja consolidada. Além disso, os estudos sobre aprendizagem e memória objetivam estabelecer ligações entre o comportamento animal, os circuitos envolvidos, os mecanismos fisiológicos ativados e os processos moleculares que suportam estes mecanismos, bem como as regiões cerebrais recrutadas no processamento da memória. O córtex cingulado posterior (CCP) ocupa uma posição estratégica no circuito de Papez do processamento da emoção e medeia sinais entre a formação hipocampal e o neocórtex associativo. Estudos prévios demonstraram que a consolidação da memória no CCP, na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA, é sensível ao sistema adenosinérgico. De fato, a adenosina é um potente neuromodulador que exerce suas ações através de receptores específicos com ações excitatórias ( $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ ) ou inibitórias ( $A_1$  e  $A_3$ ). Diversos estudos têm demonstrado o papel da adenosina em diferentes situações fisiológicas, tais como memória. No entanto, estes estudos são limitados a algumas tarefas comportamentais e regiões cerebrais. No capítulo 1, estudamos o efeito de agonistas e antagonistas de ambos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , infundidos no CCP, na evocação da memória de longa duração na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA. Nossos resultados demonstraram que a ativação dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , antes da evocação, tem efeito amnésico. Além disso, ambos agiram nos seus respectivos receptores, possivelmente recrutando vias de sinalização diferentes, demonstrando que as vias bioquímicas corticais envolvidas na consolidação e na evocação da memória não são idênticas. No capítulo 2, verificamos que o antagonista de receptores  $A_1$ , DPCPX, prejudicou a habituação ao novo ambiente, sendo este efeito oposto ao encontrado na esQUIVA INIBITÓRIA, onde o DPCPX melhorou a consolidação da memória. Isto sugere que memórias associativas e não-associativas recrutam mecanismos diferentes para sua formação. No capítulo 3, investigamos de que forma a cafeína, antagonista adenosinérgico não-seletivo, agiria na evocação da memória nas tarefas de esQUIVA INIBITÓRIA e labirinto aquático de Morris. Muitos dos efeitos da cafeína devem-se principalmente ao fato dela, ao agir nos receptores  $A_{2A}$ , modular a função motora do sistema dopaminérgico. Sendo assim, escolhemos o haloperidol, antipsicótico típico que age como antagonista dos receptores  $D_2$ , para estudar os efeitos da interação entre receptores adenosinérgicos e dopaminérgicos. Além disso, a utilização deste neuroléptico deve-se também ao fato

do haloperidol possuir efeitos sedativos e prejuízos cognitivos. A cafeína foi capaz de reverter o efeito amnésico induzido pelo haloperidol, na evocação da memória para a tarefa de esquiva inibitória. Quanto à atividade locomotora, medida no campo aberto, a cafeína reverteu o efeito sedativo do haloperidol, sendo que esta reversão não ocorreu, quando a tarefa utilizada foi o labirinto aquático de Morris que mede memória espacial. Além disso, a cafeína, na dose de 1 mg/Kg, interferiu nos níveis de ansiedade medida no labirinto em cruz elevado, sendo que este efeito ansiolítico foi revertido pela co-administração do haloperidol. Os resultados desta tese, em conjunto, sugerem que a funcionalidade do sistema adenosinérgico, em nível de sistema nervoso central, é necessária para que os processos de consolidação e evocação da memória sejam realizados em diferentes paradigmas comportamentais.



**ABSTRACT**

Memory can be defined as the storage and retrieval of an acquired learning. Consolidation of an acquired learning is a dynamic process and requires the activation of several signaling systems. There are different types of memory, which are stored in distinct cerebral regions, being possible to access them, in animal models, utilizing different behavioral paradigms. Studies about learning and memory point out to established links between animal behavioral, circuits involved, physiological mechanisms and molecular process which supported these mechanisms, as well the cerebral regions recruited in the memory processing. The posterior cingulate cortex (PCC) is strategically located in the Papez circuit of emotion processing. The PCC mediates signals between hippocampal formation and associative neocortex. Previous studies demonstrated that inhibitory avoidance memory consolidation in the PCC is sensible to adenosinergic system. In fact, adenosine is a neuromodulator which exerts its actions through specific receptors with excitatory ( $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ ) and inhibitory ( $A_1$  e  $A_3$ ) actions. Several studies have demonstrated the role of adenosine in memory processes. However, these studies are limited to few behavioral tasks and cerebral regions. In first chapter of this thesis, we verified that adenosine  $A_1$  antagonist, DPCPX, impaired habituation to a novel environment, being this effect opposite to the effect of DPCPX in inhibitory avoidance. This suggests that associative and non-associative memories recruit different mechanisms during its formation. The biochemical pathways involved in memory retrieval are not identical to memory consolidation. In chapter two, we studied the effects of adenosine receptors agonists and antagonists administered intra-PCC, in the inhibitory avoidance long-term memory expression. Our results demonstrate that activation of adenosine  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors, before a memory retention test session, has amnesic effects. Besides, both agonists activated its receptors, possibly by different signaling pathways. In chapter three, we investigated whether caffeine, a nonspecific antagonist of adenosine receptors, had any effect in inhibitory avoidance and Morris Water maze memory retrieval. Most of caffeine effects on motor function are due to its capacity to modulate the dopaminergic system. Then, we choose the antipsychotic haloperidol, which acts as an antagonist of dopamine  $D_2$  receptors, to study adenosine and dopamine receptors interactions, since haloperidol presents sedative effects and impaired cognitive function. Caffeine was able to blockade the effect of haloperidol in inhibitory avoidance task and locomotion. On the other hand, haloperidol abolished the caffeine effect to increase the anxiety behavior in the plus maze. In the Morris water maze, a task that measures spatial memory, we did not observe caffeine/haloperidol interactions. The results of

this thesis suggest that the functionality of adenosinergic system in central nervous system is necessary for the processing of information during consolidation and retrieval memory of different behavioral paradigms.

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1.1.</b> Componentes originais do circuito de Papez.....	8
<b>FIGURA 1.2.</b> Desenho esquemático de uma secção de cérebro de rato.....	10

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>TABELA 1.1.</b> Classificação dos receptores de adenosina.....	18
<b>TABELA 1.2.</b> Efeitos da adenosina sobre testes de aprendizado e memória.....	21

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AP5 – ácido aminofosfonopentanóico

CAMKII – proteína quinase do tipo II dependente de cálcio/calmodulina

CPA – N<sup>6</sup>-ciclopentiladenosina

DAG – diacilglicerol

DPCPX - 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina

GABA -  $\gamma$ -ácido aminobutírico

IP3- inositol 1, 4, 5- trifosfato

LTD – depressão de curta duração

LTP – potenciação de longa duração

NMDA – *N*-metil-*D*-aspartato

PKA – proteína quinase A, proteína quinase dependente de AMP cíclico

PKC – proteína quinase C

PLC – fosfolipase C

CGS21680 - 2-[*p*-(2-carbonil-etil)-feniletilamino]-5'-*N*-  
etilcarboxamidoadenosina

ZM241385 - 4-(2-[7-amino-2-[2-furyl]-[1,2,4] triazolo[2,3- $\alpha$ ] {1,3,5}  
triazin-5-yl-amino]ethyl)phenol

### 1.1. CONCEITOS BÁSICOS DE MEMÓRIA.

A memória é a capacidade, que têm o homem e os animais, de armazenar informações que podem ser recuperadas e utilizadas posteriormente. Do ponto de vista evolutivo, a capacidade de adquirir novas informações é uma das mais importantes e elementares funções do sistema nervoso central (SNC), sendo a expressão de memórias previamente adquiridas crucial para sobrevivência das espécies (Morgado, 1999).

A memória compreende três etapas (Izquierdo, 2002), sendo a primeira delas denominada **aquisição** ou aprendizagem, que consiste na obtenção de uma informação ou conjunto de informações por sistemas neurais específicos. A informação pode ser de índole conceitual (toda a neurobiologia, idioma inglês: memória **semântica**), de eventos ou autobiográfica (memória **episódica**), envolver hábitos ou procedimentos sensoriais e motores (nadar, andar de bicicleta: memória **de procedimentos** ou **hábitos**). As memórias semântica e episódica se denominam **declarativas**, porque os humanos as podem descrever ou declarar em detalhe e são processadas por circuitos cerebrais que incluem o hipocampo e suas conexões (amígdala e regiões corticais, tais como córtices entorrinal e cingulado) (Izquierdo, 2002).

Após a aquisição, segue-se a **consolidação**, ou seja, a fixação e o armazenamento de uma informação recém adquirida ou aprendida. A consolidação é o processo que estabiliza memórias (Dudai, 2004). Inicialmente é vulnerável, mas ao longo do tempo (horas ou dias), a consolidação torna-se resistente e este fortalecimento do traço mnemônico ocorre em nível celular e molecular (McGaugh, 2000; Dash et al., 2004; Dudai, 2004). Enquanto a consolidação é processada, um sistema de **memória de curta duração** faz uma cópia paralela da

memória e a mantém disponível para a evocação durante várias horas. A memória de curta duração tem sistemas bioquímicos próprios, diferentes daqueles ocorridos na memória de longa duração, em regiões como o hipocampo e o córtex entorrinal (Izquierdo et al., 1998). Uma vez realizada a consolidação, os aspectos selecionados de cada memória, durante sua retenção, ficam de algum modo disponíveis para serem lembrados. Com o passar do tempo, alguns desses aspectos ou mesmo todos eles podem desaparecer ou permanecer na memória.

À última etapa dá-se o nome de **evocação** ou lembrança. Em 1980, William James postulou que: "*A única prova de que está havendo retenção de memória é quando podemos evocá-la*". Embora algumas evocações de memória ocorram de forma espontânea, como resultados de uma flutuação na atividade neural, a evocação usualmente ocorre como resultado da integração entre a chegada da informação do meio ambiente com a rede de memórias já existente. A evocação da memória leva à formação de novas memórias, combinadas com as memórias anteriores (Izquierdo & McGaugh, 2000; Izquierdo & Medina, 1997a).

Como resultado das ações conjuntas destas três etapas (aquisição, consolidação e evocação), ocorre a formação real ou potencial de um novo comportamento, ou modificação de um pré-existente.

Levando em conta o tempo de retenção, é possível classificar as memórias em **memória de trabalho** ou ultra-rápida (working memory), memória de **curta duração** (short-term memory, STM) e memória de **longa duração** (long-term memory, LTM). Já quanto ao conteúdo, podemos distinguir a memória **implícita**, a memória **explícita** e a memória **operacional**. A primeira é a memória dos hábitos, procedimentos e regras, todas elas formas de memória que não podem ser descritas facilmente com palavras. A memória implícita de acordo com Shacter (1987), "*é revelada quando a experiência prévia facilita o desempenho numa tarefa que não requer a evocação*

*consciente ou intencional daquela experiência*". Ao contrário, a memória explícita pode ser descrita com palavras, e consiste em um subtipo chamado episódico (a memória de fatos que ocorrem ao longo do tempo) e um subtipo chamado semântico (a memória de conceitos atemporais). Finalmente, a memória operacional é a que nos serve para utilização rápida do raciocínio e no planejamento do comportamento. Embora as memórias sejam didaticamente classificadas e separadas umas das outras, cabe salientar que memórias implícitas e explícitas não são sempre independentes. As recordações inconscientes (implícitas) podem ser moduladas ou modificadas por memórias explícitas. As recordações explícitas também podem conter componentes da memória implícita. Por exemplo, é difícil evocar uma memória procedural (hábito) sem lembrar alguma situação prévia em que esse ato nos tenha produzido prazer, desprazer, ou seja, que tenha sido associado a alguma situação determinada. Há inclusive tarefas que pode aprender-se tanto de forma implícita quanto explícita e cada uma delas requer regiões cerebrais diferentes originando memórias com propriedades também diferentes, mas o mais freqüente é que ambos os tipos (implícitas e explícitas) interajam (Izquierdo et al., 2003, Fuster, 1998).

## **1.2. BASES CELULARES E MOLECULARES DA MEMÓRIA**

As alterações moleculares do processo de aprendizagem e memória são devido à ocorrência de plasticidade sináptica, fenômeno característico do SNC. O conceito de plasticidade é extremamente amplo, incluindo todas as formas de reorganização duradoura que ocorrem em um cérebro maduro. Essas reorganizações podem ocorrer sob o aspecto fisiológico (propriedades funcionais adquiridas pelos neurônios), morfológico (morfologia e ultraestrutura da glia) ou bioquímico (atividades enzimáticas, transdução de sinal e mudanças na



expressão gênica) (Au Louis et al., 1997). O cérebro tem a extraordinária capacidade de desenvolver respostas plásticas durante longos períodos, podendo durar por toda a vida, sendo que a plasticidade funcional está acoplada a mudanças estruturais de longa duração (Au Louis et al., 1997; Izquierdo, 2002). Estudos demonstraram que o SNC pode exibir plasticidade sináptica sutil e específica em resposta a uma dada atividade, como por exemplo, o aprendizado de uma nova tarefa (Cotman, 1998).

Uma das primeiras propostas para explicar os mecanismos celulares envolvidos na memória surgiu em 1911. Neste ano, Ramón e Cajal sugeriram que novos conhecimentos eram representados por alterações nas conexões neuronais existentes e não por um aumento no número de células neuronais. Posteriormente, Hebb (1949) em seu clássico livro "The organization of Behaviour" propôs que memórias são adquiridas e armazenadas sob a forma de alterações na eficiência de conexões sinápticas entre neurônios ativados durante o aprendizado.

Durante esta última década, foram identificados muitos eventos celulares envolvidos em alterações morfológicas e funcionais nas sinapses relacionadas com o aprendizado, sustentando e ampliando as idéias propostas tanto por Ramón e Cajal quanto por Hebb.

No SNC de mamíferos, dois importantes fenômenos plásticos têm sido descritos: a potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD) (Bliss & Lomo, 1973; Au Louis et al., 1997).

A LTP, sendo um tipo de plasticidade neuronal, foi primeiramente observada em hipocampo e subseqüentemente em muitas outras regiões cerebrais, tais como o córtex entorrinal (Jeffery, 1997) e o córtex cingulado posterior (Hedberg & Stanton, 1995). Imediatamente após sua descoberta, a LTP foi reconhecida como um mecanismo básico para memória. Sendo assim, a hipótese de explicar a memória através da LTP tornou-se habitual (Izquierdo & Medina, 1995a; Malenka & Nicoll,

1999). No entanto, ainda não há estudos que comprovem a existência de uma memória dependente de LTP, ou a ocorrência de LTP durante a formação da memória, estabelecendo, então, uma correlação entre as duas (Izquierdo & Medina, 1997 a,b). De fato, a LTP é somente um modelo para mudanças sinápticas de longa duração complexas e altamente reguladas, que podem acompanhar a aprendizagem *in vivo*. Em geral a LTP é medida *in vitro*, e por isso não reflete as numerosas modulações tanto de sua aquisição como de sua manutenção ou evocação e fazem com que não possa ser tida *ipsis literis* como um modelo total da memória (Izquierdo & Medina, 1997a; Izquierdo, 2002; revisado por Silva et al., 2000). Logo, a LTP pode ser vista como um modelo parcial para a memória medida em nível eletrofisiológico (Bliss & Collingridge, 1993).

Um outro fenômeno envolvido nas alterações sinápticas de longa duração que pode corresponder a uma base neurofisiológica para a memória é a LTD (Linden, 1994). A LTD compreende uma persistente redução na eficiência sináptica, a qual ocorre tipicamente depois de repetidas estimulações aferentes de baixa frequência. Recentemente, foi reportado que a LTD na região CA1 do hipocampo pode ser associada com a aquisição de memória em ratos (Braunewell & Manahan-Vaughan, 2001). A expressão da LTD na região CA1 pode também ser aumentada em condições de estresse. Isto sugere um papel mais complexo para esta forma de plasticidade do que simplesmente servir para a prevenção da saturação sináptica, como, por exemplo, revertendo a LTP (Braunewell & Manahan-Vaughan, 2001).

### **1.3. LOCALIZAÇÃO DAS MEMÓRIAS DECLARATIVAS NO NEOCÓRTEX**

Os estudos sobre aprendizagem e memória objetivam estabelecer ligações entre o comportamento animal, os circuitos envolvidos, os

mecanismos fisiológicos ativados e os processos moleculares que suportam estes mecanismos, bem como as regiões cerebrais recrutadas no processamento da memória.

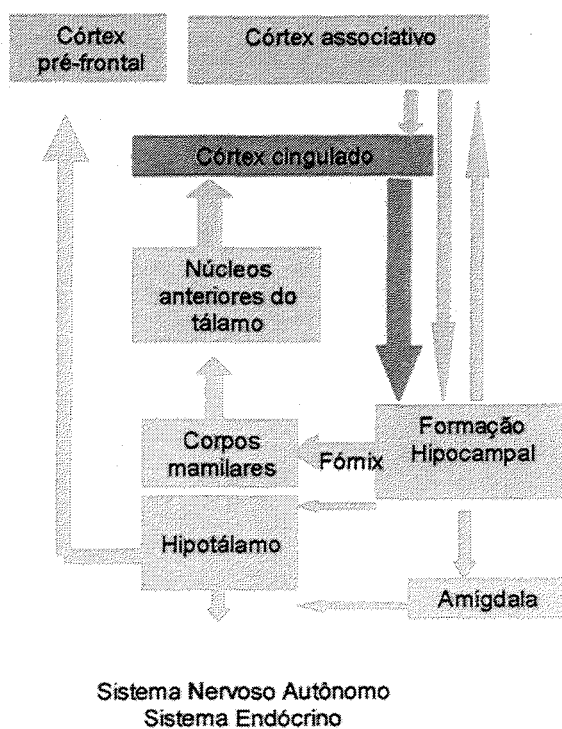
A representação física ou a localização de uma memória é chamada de engrama, também conhecido como traço de memória. De acordo com Hebb (1949), se um engrama está baseado em informação oriunda de apenas uma modalidade sensorial, deveria ser possível localizá-la dentro das regiões do córtex que servem a essa modalidade. Por exemplo, se o engrama baseia-se apenas em informação visual, então esperaríamos que ele estivesse localizado no córtex visual.

O neocórtex é uma região do cérebro composta por muitas camadas celulares e é encontrado somente em mamíferos. Korbinian Brodmann, no início do século XX (1909), construiu um mapa citoarquitetônico do neocórtex. Nesse mapa, cada área do córtex que tenha uma citoarquitetura em comum possui um número que a identifica. Joan Kaas e colaboradores (1970) estudaram a estrutura e a função de diferentes áreas corticais em muitas espécies. Seus achados sugerem que o neocórtex primordial consiste principalmente em três tipos de córtex. O primeiro tipo consiste de áreas sensoriais primárias que são as primeiras a receber sinais das vias sensoriais ascendentes. O segundo tipo de neocórtex consiste de áreas sensoriais acessórias, assim designadas devido suas interconexões com as áreas sensoriais primárias. O terceiro tipo consiste de áreas motoras que estão intimamente envolvidas com o controle do movimento voluntário. Quando se fala em expansão do córtex na evolução de mamíferos, o que cresceu foi a região que se localiza entre as áreas sensoriais e motoras primárias. Os estudos de Kaas mostram que muitos dos córtices "intermediários" espelham basicamente a expansão do número de áreas sensoriais secundárias encarregadas da análise da informação sensorial (Kaas, 1993; Kaas, 2004).

As informações sensoriais, provenientes de receptores periféricos são processadas ao longo de vias claramente definidas e anatomicamente distintas que seguem para o neocórtex. Os componentes de uma via constituem, coletivamente, um sistema. Desde 1930, alguns cientistas têm argumentado que há um sistema responsável pela experiência das emoções. Este veio a ser conhecido como sistema límbico. Em um artigo publicado em 1878, o neurologista francês Paul Broca notou que todos os mamíferos possuem, na superfície medial do cérebro, um grupo de áreas corticais que são bastante distintas do córtex circundante. Utilizando a palavra latina para borda (*limbus*), Broca designou esta coleção de áreas corticais como sendo o lobo límbico, porque elas formam um anel, ou borda, ao redor do tronco encefálico. De acordo com essa definição, o lobo límbico consiste do córtex ao redor do corpo caloso, principalmente no giro cingulado, e o córtex na superfície medial do lobo temporal, incluindo o hipocampo. Por volta de 1930, evidências sugeriram que algumas estruturas límbicas estivessem envolvidas na emoção. James Papez (1937) propôs que houvesse, na parede medial do encéfalo, um "sistema de emoção" que ligaria o córtex com o hipotálamo. Revendo a literatura anatômica da época, Papez percebeu que essas regiões eram conectadas reciprocamente de modo "circular", o que revelava uma rede neural que ficou depois conhecida como circuito de Papez (Fig. 1.1). Mais tarde, este circuito passou a ser conhecido como sistema límbico. O circuito original incluía: (1) o córtex cingulado, (2) o hipocampo, (3) o hipotálamo; e (4) os núcleos anteriores do tálamo. Outras regiões foram adicionadas posteriormente.

O córtex cingulado sabidamente recebe projeções do córtex associativo e com ele forneceria a base para a experiência subjetiva das emoções (Bear, 2002). Algumas vezes, lesões em certas áreas corticais promovem mudanças profundas na expressão emocional com poucas

mudanças na percepção ou inteligência. Além do mais, tumores próximos ao córtex cingulado estão associados com certas perturbações emocionais, incluindo medo, irritabilidade e depressão. No circuito, o córtex cingulado afeta o hipotálamo através do hipocampo e do fórnix, enquanto que o hipotálamo afeta o córtex cingulado pelo tálamo anterior (Bear et al., 2002).



**Fig.1.1:** Componentes originais do circuito de Papez (interligados por setas grossas), e aqueles acrescentados por outros pesquisadores (interligados por setas finas). Modificado por S. Iversen e colaboradores (2000).

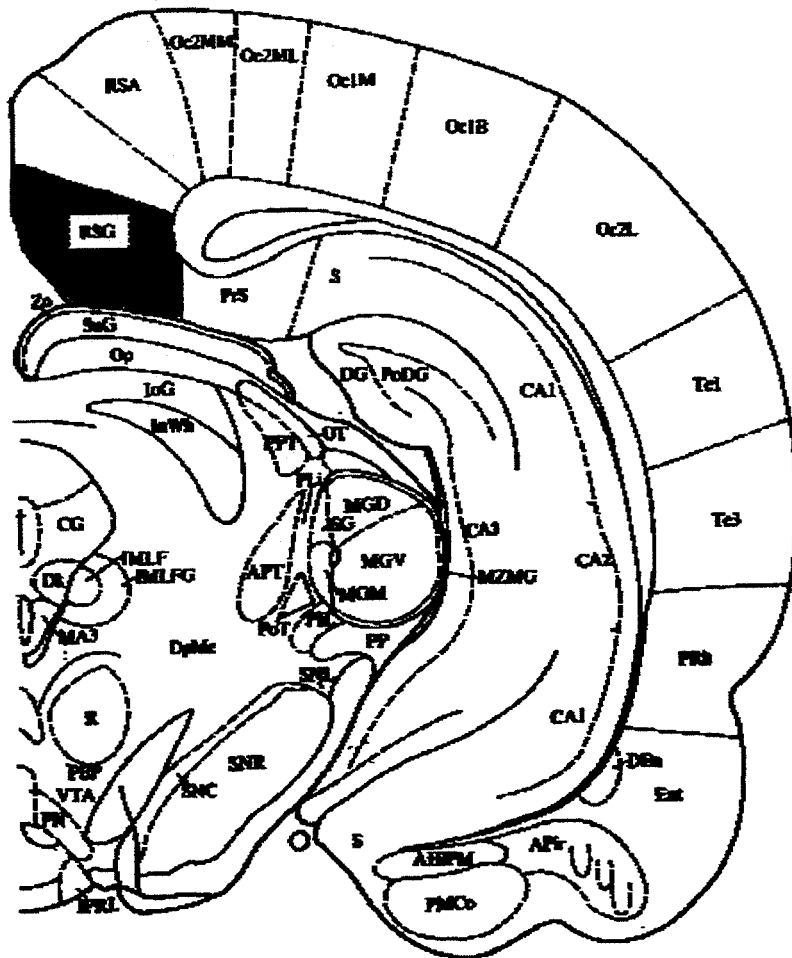
O córtex cingulado (CCP) (Fig. 1.2.) ocupa uma posição estratégica no circuito de Papez do processamento da emoção, mediando sinais entre a formação hipocámpica e o neocórtex associativo (Bear, et al., 1995; Martin, 1996; Zilles & Wree, 1995). O núcleo talâmico anterior recebe um número de projeções diretas e indiretas do hipocampo e projeta diferentemente a ambos córtex cingulado anterior (CCA) e ao córtex cingulado posterior (CCP) (Horikawa et al., 1988; Shibata, 1993; Vogt et al., 1981). Postula-se que este circuito tenha uma função comparativa, aonde os dados que chegam são comparados

com dados mnemônicos e se eles estiverem se equiparando, respostas comportamentais já projetadas são executadas, se não estiverem, informações são geradas intensificando a atenção e inibindo as ações planejadas (Kubota & Gabriel, 1995).

O CCP é também conhecido como córtex retrosplenial (Zilles & Wree, 1995) e exibe frequência teta coerente com o que ocorre no hipocampo (Hedberg et al., 1993; Leung & Borts, 1987), e ambas LTP e LTD têm sido descritas no CCP (Hedberg & Stanton, 1995). Além disso, o CCP medeia a memória espacial em ratos (Sutherland & Hoising, 1993) e o desenvolvimento de estratégias em ratos submetidos à tarefa espacial em labirinto aquático (Riekkinen et al., 1995). Estudos recentes demonstraram que a consolidação da memória no cíngulo posterior para a tarefa de esQUIVA inibitória é sensível a infusões de muscimol, um agonista de receptores  $\gamma$ -ácido aminobutírico tipo A (GABA<sub>A</sub>) e de AP5, um antagonista de receptores NMDA (Mello e Souza et al., 1999).

#### **1.4. TIPOS DE APRENDIZADO E TAREFAS COMPORTAMENTAIS**

Como visto anteriormente, existem diferentes tipos de memória que são por sua vez armazenadas em diferentes regiões cerebrais. Desta forma, é possível acessar os diferentes tipos de aprendizagem e memória em animais utilizando-se diferentes paradigmas comportamentais.



**Fig. 1.2.:** Desenho esquemático de uma secção de cérebro de rato no plano coronal A - 0.58 cm do atlas de Paxinos e Watson (1986) mostrando (em pontilhado) a extensão do cíngulo posterior.

#### 1.4.1. Aprendizado não-associativo

O aprendizado **não-associativo** descreve a alteração de um comportamento em resposta a um único tipo de estímulo. Há dois tipos: **habituação** e **sensibilização** (Bear et al., 2002).

Na sensibilização, um estímulo forte que previamente evocava pouca ou nenhuma reação resulta em uma resposta exagerada para todos os estímulos subsequentes.

Para entender a habituação, podemos utilizar um exemplo. Suponha que você vive em uma pensão onde há apenas um telefone no saguão. Quando o telefone toca, você corre para atender. Mas a cada vez que o faz, a ligação é para outra pessoa. Com o tempo, você pára de reagir à campainha do telefone, e eventualmente nem mesmo a ouve. Neste tipo de aprendizado, habituação, aprende-se a ignorar um estímulo que não tenha significado. Diariamente nos habituamos a uma série de estímulos.

Tanto a habituação quanto a sensibilização são consideradas, por muitos pesquisadores (mas há controvérsias), formas não-associativas de aprendizagem porque através de um único estímulo é possível preparar ações de modo apropriado ou manter-se alerta. Portanto, esses são mecanismos muito úteis à sobrevivência dos animais. Talvez por isso originaram-se tão precocemente durante a evolução, e mantiveram-se preservados até a espécie humana (Lent et al, 2002).

#### **1.4.1.1. Campo aberto ou Open Field**

A tarefa mais utilizada para avaliar a habituação em ratos chama-se campo aberto ou "open field". Sabe-se que para o estabelecimento da habituação de longa duração no hipocampo são necessários receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA, bem como a ativação da CAMKII (Izquierdo et al., 1992, 1999, Vianna et al, 2000, 2001). No entanto, quando comparada com a tarefa de esquiva inibitória, que será posteriormente discutida, a habituação envolve mecanismos bioquímicos diferentes e a até certo ponto mais simples (Vianna et al., 2001), o que é compreensível, já que a habituação a um novo ambiente é uma das formas mais elementares e antigas de aprendizado.



### 1.4.2. Aprendizado associativo

Diferentemente do que foi visto acima, durante o aprendizado associativo, formamos associações entre eventos. Normalmente distinguimos dois tipos: condicionamento clássico e condicionamento instrumental.

O **condicionamento clássico** foi descoberto e primeiramente estudado por Ivan Pavlov durante a primeira metade do século XX (1927). Este tipo de aprendizado envolve a associação entre um estímulo que evoque uma resposta mensurável e um segundo estímulo que, normalmente, não evoca esta resposta. O primeiro tipo de estímulo, aquele que normalmente evoca a resposta, é chamado de estímulo incondicionado (US, do inglês *unconditioned stimulus*), porque nenhum treino (ou condicionamento) é requerido para provocar uma resposta. O segundo tipo de estímulo, aquele que normalmente não evoca a mesma resposta, é chamado de estímulo condicionado (CS, do inglês *conditioned stimulus*), porque este requer treino (condicionamento) antes que produza esta resposta.

No **condicionamento instrumental** ou operante, o indivíduo aprende a associar uma resposta, um ato-motor, com um estímulo significativo. O condicionamento instrumental também ocorre se uma resposta, em vez de evocar uma recompensa, prevenir um estímulo aversivo, como um choque nas patas. No condicionamento instrumental, aprende-se que um comportamento particular está associado a uma determinada consequência.

A base do condicionamento clássico é a associação entre estímulos, enquanto a base do condicionamento operante é a associação entre o estímulo e o comportamento do animal. Embora uma distinção teórica entre os dois tipos de aprendizagem e seus tipos correspondentes de comportamentos pareça justificada e seja útil para certas descrições teóricas de aprendizagem, os tipos são, sob muitos

aspectos, mais semelhantes que diferentes. Na realidade, a generalização de estímulo e resposta, inibição, extinção e discriminação podem ser demonstradas com os dois tipos de aprendizagem (Deese & Hulse, 1975).

#### **1.4.2.1. Esquiva inibitória**

A tarefa de esquiva inibitória envolve o aprendizado de uma tarefa aversiva onde, na sessão de treino, o animal recebe um choque de baixa intensidade ao descer da plataforma. Na sessão de teste, que pode ocorrer em vários tempos pós-treino, o animal é exposto novamente àquele ambiente, testando-se então sua memória. Para avaliar o quanto o animal aprendeu, mede-se o tempo de latência em que este permanece na plataforma, ou seja, a retenção da tarefa. Trata-se de um aprendizado adquirido em uma única tentativa, tornando-o ideal para o estudo de processos iniciados no treino (Gold, 1986; Izquierdo & Medina, 1997a).

Na esquiva inibitória ou passiva o animal desce de uma plataforma e então recebe o choque; por consequência, o animal aprende a não ir mais ao compartimento ou evitar aquela resposta. Também esse tipo de teste pode envolver ambos os tipos de aprendizagem. Por um lado o estímulo aversivo é aplicado em associação com um estímulo inicialmente "neutro", como é o caso dos estímulos do ambiente em que o choque nas patas é aplicado, caracterizando um condicionamento do tipo clássico. Por outro lado, esse choque nas patas é aplicado após uma resposta do animal - descer da plataforma. Nesse último caso, o reforço negativo diminui a probabilidade de resposta, sendo essa relação reforço-resposta característica do condicionamento operante (Xavier, 1982, para revisão).

O aprendizado de esquiva inibitória em ratos desencadeia uma série de alterações bioquímicas que são necessárias para a retenção

desta tarefa, sendo estas similares àquelas descritas para outras formas de plasticidade neural (Bliss & Collingridge, 1993; Maren & Baudry, 1995; Izquierdo & Medina, 1995, 1997 a). Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória desta tarefa no hipocampo envolvem a ativação de receptores ionotrópicos NMDA e AMPA, receptores metabotrópicos e um aumento dos níveis de NMDA1 e GluR1, subunidades dos receptores NMDA e AMPA, respectivamente (Izquierdo & Medina, 1995; Cammarota et al., 1996; Riedel, 1996). Além disso, cascatas bioquímicas desencadeadas por proteínas quinases participam da formação da memória de esquiva inibitória. Evidências indicam que a ativação das cascatas mediadas por proteína quinase G, CAMKII, proteína quinase C e a proteína quinase A são fundamentais na fase inicial da plasticidade de longa duração induzida pela esquiva inibitória, minutos após a realização do treino (Ito et al., 1991; Bernabeu et al., 1995, 1996, 1997; Cammarota et al., 1997; Izquierdo & Medina, 1997a).

Os eventos bioquímicos são regulados logo após o treino por mecanismos hormonais relacionados com a ansiedade e estresse, sendo modulados por sinapses GABAérgicas, colinérgicas, noradrenérgicas e por mensageiros retrógrados. A fase mais tardia, 3-6 horas após o treino, é modulada por mecanismos relacionados ao humor e afeto, envolvendo vias dopaminérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas (Izquierdo & Medina, 1997a, b).

#### **1.4.3. Atividade exploratória e memória em labirintos**

Embora seja ainda de difícil definição, o termo "atividade exploratória" é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. Num sentido geral, refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente,

as quais abrangem não só as respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas.

Os labirintos delimitam rotas pelas quais o animal pode explorar determinado local, como o labirinto radial e os labirintos em forma de "T", "+" e "Y", que se baseiam na escolha, pelos animais, de diferentes braços. Normalmente, labirintos pressupõem que animais aprendam determinada localização que lhes ofereça segurança, comida, ou outra situação ou objeto desejado. Essas informações sobre diferentes locais de um labirinto devem ser aprendidas e armazenadas por períodos variáveis de tempo (O'Keefe & Nadel, 1978). Destacaremos aqui dois tipos de labirintos: o labirinto em cruz elevado, tradicionalmente utilizado para verificar possíveis efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de fármacos e o labirinto aquático de Morris, utilizado no estudo da memória espacial em ratos.

#### **1.4.3.1. Labirinto em cruz elevado ou "Plus maze"**

O labirinto em cruz elevado, ou "plus maze", consiste de dois braços abertos opostos a dois braços fechados por paredes e combina elementos desconhecidos, abertos e elevados (File, 1992). Este labirinto tem sido extensivamente utilizado pra verificar possíveis efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de drogas (Handley & Mitani, 1984; Pellow et al., 1985; Lister, 1987). Drogas padrões ansiolíticas e ansiogênicas aumentam e diminuem, respectivamente, tanto o número de entradas nos braços abertos, como o tempo de permanência do animal nestes. Além disso, essa tarefa é utilizada pra medir níveis de comportamento ansiosos espontâneos (Goto et al., 1993), antinocicepção induzida por ansiedade (Lee & Rodgers, 1990; Frussa-Filho et al. 1992; Rodgers et al., 1992) e avaliar memória (Itoh et al., 1990).

#### **1.4.3.2. Labirinto aquático de Morris ou Water maze**

Dentre os diversos procedimentos e aparelhos desenvolvidos para avaliar o desempenho de animais em labirintos, o teste de aprendizagem espacial - no labirinto aquático - introduzido no século passado por Richard Morris (1982), vêm se destacando nos estudos sobre a neurobiologia da memória (Gallagher et al., 1993).

O labirinto aquático é intensamente utilizado em pesquisas sobre as capacidades de orientação espacial em roedores, sobre a retenção dessas informações no sistema nervoso por períodos variáveis de tempo, bem como na investigação dos mecanismos neurais subjacentes a essas capacidades. Por exemplo, (1) Whishaw e colaboradores (1987) encontraram prejuízos na aquisição, retenção e seleção de estratégias espaciais em ratos, após lesões da porção medial do caudado-putamen; (2) Morris et al., (1986) realizaram testes no labirinto aquático com animais submetidos ao tratamento com AP5, um antagonista de receptor NMDA. Os resultados demonstraram que a aplicação de AP5 prejudica a localização espacial dos animais, e que o bloqueio dos receptores de glutamato do tipo NMDA, não altera a transmissão sináptica no hipocampo, mas previne a indução da potenciação de longa duração (LTP), após breve estimulação de alta-freqüência. Esses resultados sugerem que os receptores NMDA estão envolvidos na aprendizagem espacial e reforçam a idéia de que LTP esteja envolvida em algumas formas de aprendizagem.

Todas as tarefas citadas e explicadas acima; campo aberto, esquivas inibitórias, labirinto em cruz elevado e labirinto aquático de Morris são utilizados para o estudo do comportamento e/ou memória em animais. Diferentes vias e sistemas de sinalização são requeridos para o estabelecimento destas tarefas. Aqui salientaremos os sistemas adenosinérgico e dopaminérgico que foram alvo de nossos estudos.

## 5. SISTEMA ADENOSINÉRGICO

A adenosina é uma purina endógena com importante papel na regulação da excitabilidade neuronal e na transmissão sináptica de baixa frequência, sendo também considerada como neuromodulador no fenômeno de plasticidade sináptica (revisado por Ribeiro et al., 2003).

A adenosina é liberada por muitas células, incluindo neurônios e células gliais. Ela modula a atividade do sistema nervoso central agindo, pré e pós-sinápticamente, inibindo ou facilitando a liberação de neurotransmissores (Sebastião & Ribeiro, 2000).

A adenosina medeia seus efeitos através da ativação de receptores específicos. Os receptores  $A_1$  e  $A_3$  inibem a adenilato ciclase, diminuindo a quantidade de AMPc, enquanto os subtipos  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  estimulam a adenilato ciclase e produzem efeitos excitatórios no sistema nervoso central (Dunwiddie & Masino, 2001) (Tabela 1).

Os receptores  $A_1$  medeiam respostas amplas devido ao fato de estarem acoplados a diferentes proteínas G, da família  $G_i/G_o$  (Ralevic & Burnstock, 1998). A via mais reconhecida da ação dos receptores  $A_1$  é a da inibição da adenilato ciclase, causando uma diminuição no segundo mensageiro, AMPc. Isto modula a atividade da proteína quinase dependente de AMPc, a qual fosforila diversas proteínas marcadoras. O receptor  $A_1$  acoplado a adenilato ciclase tem sido descrito em vários tecidos, incluindo o tecido nervoso e adiposo. Adicionalmente, a modulação direta das vias que diminuem o AMPc, via inibição da adenilato ciclase, bloqueia os efeitos de outros agentes, os quais agem por estimular a adenilato ciclase (Ralevic & Burnstock, 1998). Outro mecanismo sinalizador dos receptores  $A_1$  é a ativação da fosfolipase C (PLC), levando ao metabolismo do fosfoinositol de membrana com o conseqüente aumento de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG) e mobilização de cálcio (Ralevic & Burnstock, 1998).

Tabela 1. Classificação dos receptores de adenosina

	A <sub>1</sub>	A <sub>2A</sub>	A <sub>2B</sub>	A <sub>3</sub>
Proteína G	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub>	G <sub>s</sub>	G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub>	G <sub>i</sub> , G <sub>q</sub>
Efeitos	↓ AMPc ↑ IP3 ↑ K <sup>+</sup>	↑ AMPc	↑ AMPc ↑ IP3	↓ AMPc ↑ IP3
Agonistas seletivos	CPA, CHA, R-PIA	CGS21680, APEC, WRC-0470	—	IB-MECA
Antagonistas seletivos	DPCPX, XAC, WRC 0571	CSC	—	MRS 1067

Adaptado a partir de RALEVIC & BURNSTOCK, 1998

Abreviações utilizadas: APEC, 2-[(2-aminoetilamino)carboniletilfeniletilamino]-5'-N-etilcarboximidoadenosina; CGS21680, 2-[p-(2-carbonil-etil)-feniletilamino]-5'-N-etilcarboxamidoadenosina; CHA, N<sup>6</sup>-ciclohexiladenosina; CPA, N<sup>6</sup>-ciclopentiladenosina; CSC, 8-(3-clorostiri)caféina; DPCPX, 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina; IB-MECA, N<sup>6</sup>-(3-iodo-benzil); MRS 1067, 3,6-dicloro-2'-isopropiloxi-4'-metilflavona; R-PIA, (R)N<sup>6</sup>-fenilisopropiladenosina; WRC 0470, 2-cicloexilmetilideneidrazinoadenosina; WRC 0571, 8-(N-metilisopropil)amino-N<sup>6</sup>-(5'-endoidroxi-endonorbonil)-9-metiladenina.

Na maioria das condições experimentais, observa-se que os efeitos da adenosina ou de seus análogos é a inibição da atividade neuronal mediada pela ativação de seus receptores do tipo A<sub>1</sub> (Dunwiddie, 1985; Greene & Hass, 1991; Cunha, 2001). Estes efeitos mediados pelo A<sub>1</sub> resultam de uma ação combinada de: (1) hiperpolarização pós-sináptica e conseqüente ativação da condutância de potássio (Dunwiddie & Fredholm, 1989; Thompson et.al., 1992) e (2)

inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissores (Proctor & Dunwiddie, 1987; Ambrósio et.al., 1997).

Além dos receptores  $A_1$  estarem acoplados a proteínas  $G_i/G_o$  (Nanoff et.al., 1995; Jockers et.al., 1994), eles podem também estar acoplados a outras proteínas G (Asano et al., 1995) ativando, então, diferentes sistemas de transdução (Akbar et.al., 1994; Santos et.al., 1998; Cascalheira & Sebastião, 1998). Em particular, a inibição da liberação de neurotransmissores mediada por  $A_1$  é, geralmente, independente dos seus efeitos sobre os níveis de AMPc. Na maioria das vezes, depende de uma inibição direta, via proteína G, dos principais canais de cálcio do tipo N (Yawo & Chuhma, 1993; Wu & Saggau, 1994).

Foi demonstrado na literatura que a adenosina exógena ou seus análogos, agindo nos receptores  $A_1$ , inibem a LTP em fatias hipocámpais (Arai et.al., 1990; de Mendonça & Ribeiro, 1990). Interessantemente, a adenosina endógena agindo sobre os receptores  $A_1$  atenua LTD em ratos neonatais (de Mendonça & Ribeiro 1997) e previne a LTD em ratos adultos (Kemp & Bashir, 1997). Além disso, o bloqueio dos receptores  $A_1$  em fatias hipocámpais, utilizando o seu antagonista DPCPX (Figura I.1.), aumenta a LTP, sendo que esta é completamente prevenida pela adição de AP5, um seletivo antagonista de receptores NMDA (de Mendonça & Ribeiro, 2000). A ligação de [ $^3$ H]DPCPX para receptores  $A_1$  de adenosina em cérebro de humanos é maior na parte mais inferior do cíngulo posterior, bem como em outras regiões corticais frontais (Svenningsson et al., 1997). A afinidade da ligação de [ $^3$ H]DPCPX no cérebro de humanos foi de 5 a 10 vezes inferior a descrita em cérebro de ratos (Johansson et al., 1993; Svenningsson & Fredholm, 1997). Tem sido mostrado que em cérebro de ratos a adição de GTP no meio de incubação aumenta a afinidade da marcação de [ $^3$ H]DPCPX (Weber et al., 1990). Estas mudanças estão provavelmente relacionadas com a



ligação de adenosina endógena a sítios de alta afinidade de receptores  $A_1$  (Svenningsson et al., 1997).

Vários agonistas de receptores  $A_1$  administrados sistematicamente têm sido reportados por diminuir a aprendizagem inibitória em camundongos (Normile & Barraco, 1991; Zarrindast & Shafaghi, 1994). Experimentos realizados em cérebro de galinhas demonstraram que o agonista de  $A_1$ , CHA, inibiu especificamente a liberação de glutamato (Daisley & Rose, 1999). O pré-tratamento com DPCPX, antagonista de receptores  $A_1$ , previne o aumento de erros na memória de trabalho induzida por intrafusão de CHA, agonista de receptor  $A_1$ , em hipocampo de ratos (Ohno & Shigenori, 1996). Desde que o sistema adenosinérgico é capaz de regular mudanças de longa duração na eficiência das sinapses, é esperado que este sistema também modifique a performance de testes experimentais de aprendizado e memória em animais. Podemos observar a amplitude dos efeitos da adenosina sobre tarefas de aprendizado e memória analisando a tabela 2.

Tem aumentado a aceitação do fato de que os efeitos neuromodulatórios da adenosina não estão restritos a sua inibição mediada pelos receptores  $A_1$ . Sabe-se que a utilização de agonistas e principalmente antagonistas de receptores  $A_{2A}$  demonstram o papel destes receptores no controle da liberação de neurotransmissores em várias regiões cerebrais (Sebastião & Ribeiro, 1996).

Os receptores  $A_{2A}$  são na maioria acoplados a proteína Gs (revisado por Ribeiro et al., 2003), mas também podem estar acoplados a proteínas Gi/GO (Cunha et al., 1999). A modulação da liberação de neurotransmissores mediada pelos receptores  $A_{2A}$  é atenuada por inibidores da adenilato ciclase e por análogos de AMPc. No entanto, inibidores da proteína quinase A (PKA) fracamente inibem (Cunha & Ribeiro, 2000) ou não afetam (Kirk & Richardson, 1995) os efeitos da ativação de receptores  $A_{2A}$ . Em contraste, inibidores da proteína quinase

C (PKC) (Kirk & Richardson, 1995; Cunha & Ribeiro, 2000) ou da fosfolipase C (Nörenberg et al., 1998) são capazes de inibir os efeitos da ativação dos receptores A<sub>2A</sub>.

Tabela 2. Efeitos da adenosina sobre testes de aprendizado e memória

<b>Testes comportamentais</b>	<b>Espécie</b>	<b>Efeito</b>	<b>Droga</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Referência</b>
<b>Aprendizado passivo</b>	camundongo	diminuição	CPA	Agonista seletivo de A <sub>1</sub>	Normile & Barraco (1991); Ohno & Watanabe (1996)
<b>Memória de trabalho Three-panel runway</b>	rato	diminuição	CHA	Agonista seletivo de A <sub>1</sub>	Ohno & Watanabe (1996)
<b>Memória de trabalho Nonmating-to-sample task</b>	rato	sem efeito	R-PIA	Agonista seletivo de A <sub>1</sub>	Pontecorvo et.al. (1991)
<b>Memória espacial Morris water maze (labirinto aquático)</b>	camundongo	aumento	CPA	Agonista seletivo de A <sub>1</sub>	Von Lubitz et.al. (1993)
<b>Aprendizado passivo Déficit induzido por escopolamina</b>	rato	aumento	KF 153772	Antagonista seletivo de A <sub>1</sub>	Suzuki et.al. (1993)
<b>Consolidação da memória para esquila inibitória</b>	rato	aumento	DPCPX	Antagonista A <sub>1</sub>	Pereira et al., 2002

Adaptado a partir de de MENDONÇA & RIBEIRO (2001).

Abreviações utilizadas: CPA, N<sup>6</sup>-ciclopentiladenosina; CHA, N<sup>6</sup>-ciclohexiladenosina; R-PIA, R-N<sup>6</sup>-fenilisopropiladenosina; KF 15372, 8-(3-diciclopropilmetil)-1,3-dipropilxantina.

Além dos receptores  $A_{2A}$ , existem os receptores  $A_{2B}$  que estão acoplados a diferentes vias sinalizadoras, incluindo a ativação da adenilato ciclase (Ralevic & Burnstock, 1998). Pouco se sabe sobre estes receptores, já que não foi ainda relatada na bibliografia a presença de agonistas seletivos para  $A_{2B}$ .

Os receptores  $A_3$  foram clonados e identificados em diferentes espécies (Meyerhof et al., 1991; Salvatore et al., 1993; Jacobson et al., 1993). A ativação de receptores  $A_3$  estimula a fosfolipase C e aumenta a geração de inositol trifosfato em fatias de cérebro de rato (Abbraccio et al., 1995a). Além disso, estes receptores também inibem a atividade de adenilato ciclase (Zhou et al., 1992; Abbraccio et al., 1995b). Entretanto, os efeitos fisiológicos dos receptores  $A_3$  no sistema nervoso central ainda permanecem desconhecidos.

O maior alvo de estudos são os receptores  $A_1$  e os receptores  $A_{2A}$ , já que eles modulam a excitabilidade neuronal. Dados encontrados na literatura demonstraram a sua co-expressão e co-localização na região CA1 do hipocampo (Cunha et al., 1994). De fato, existe uma interação funcional entre estes receptores sendo que a ativação dos receptores  $A_{2A}$ , com baixas concentrações de CGS 21680 (agonista de  $A_{2A}$ ), diminuiu a eficiência do agonista de receptores  $A_1$ , CPA, em inibir a excitabilidade hipocampal (Cunha et al., 1994). Isto indica que existe uma comunicação entre estes receptores no hipocampo, e sugere que as ações da adenosina endógena mediadas pelos receptores  $A_1$  podem ser diminuídas, se houver a concomitante ativação dos receptores  $A_{2A}$  (Cunha et al., 1994; Lopes et al., 1999).

Tem sido proposta uma inibição, mediada por receptores  $A_1$ , da ação dos receptores  $A_{2A}$ , desde que a desensibilização dos receptores  $A_1$  estriatais é acompanhada por uma amplificação, tempo dependente, da estimulação da adenilato ciclase mediada por  $A_{2A}$  (Abbraccio et al., 1995a).

### **1.5.1. Adenosina, dopamina e neurofisiopatologias**

O estudo da ação dos receptores adenosinérgicos em diferentes condições patológicas, tais como esquizofrenia, doenças de Parkinson e Alzheimer deve-se, principalmente, ao fato destes receptores serem bloqueados de forma inespecífica pela cafeína.

Um estudo demonstrou que mulheres que beberam cafeína em grandes quantidades ao longo da vida tiveram uma melhor performance em testes cognitivos e de memória do que àquelas que não bebiam café (Johnson-Kozlow et al., 2002). Embora alguns estudos não consigam estabelecer uma relação direta entre a ingestão de cafeína e o aparecimento da doença de Alzheimer (Maia e Mendonça, 2002), o possível papel protetor da cafeína contra esta doença pode levar ao desenvolvimento de novas drogas para o tratamento ou prevenção da mesma.

Quanto à doença de Parkinson, alguns estudos têm demonstrado o potencial dos receptores  $A_{2A}$  no tratamento desta doença (Fuxe et al., 2001, Morelli & Pinna, 2001). O grande indício para esta pressuposição é o fato dos receptores  $A_{2A}$  e  $D_2$  estarem co-localizados e interagirem de forma antagônica (Ferré et al., 1991). O antagonismo dos receptores  $A_{2A}$  não somente diminuiu a rigidez muscular, característica da doença de Parkinson, como também potenciou os efeitos de L-DOPA, utilizada no tratamento desta doença (Warda et al., 2001). Além disso, a catalepsia induzida por antagonismo nos receptores  $D_2$  e  $D_1$  é revertida por teofilina, metabólito da cafeína (Hauber et al., 2001).

De fato, existe uma base anatômica para a existência de interações funcionais entre os receptores  $A_1/D_1$  e  $A_{2A}/D_2$  nos mesmos neurônios. Agonistas dos receptores  $A_1$  afetam negativamente a alta afinidade dos receptores  $D_1$ . E a ativação de receptores  $A_{2A}$  leva a uma

diminuição na afinidade de agonistas  $D_2$  (Franco et al., 2000). Esta interação também é relevante no que tange o estudo da esquizofrenia.

A esquizofrenia é caracterizada por uma perda de contato com a realidade e por perturbações do pensamento, percepção, humor e movimento. Os sintomas da esquizofrenia são divididos em duas categorias: os positivos que refletem a presença de pensamentos e comportamentos anormais e os negativos, que refletem a ausência de respostas que normalmente estão presentes (Lent et al., 2002). A esquizofrenia também está associada com mudanças físicas no encéfalo, embora não sejam sempre evidentes no encéfalo dos esquizofrênicos. Além disso, diferentes sistemas de neurotransmissão têm sido implicados na patofisiologia da esquizofrenia.

A hipótese dopaminérgica da esquizofrenia postula uma hiperfunção dopaminérgica nesta desordem. A hipótese glutamatérgica sugere uma hipofunção glutamatérgica, o que pode aumentar a função dopaminérgica (Grace, 1991; Goff & Coyle, 2001).

Recentemente tem se investigado a função do sistema adenosinérgico na esquizofrenia, o que foi inicialmente proposto devido o envolvimento do gânglio basal na ação de drogas antipsicóticas e a alta densidade de receptores  $A_{2A}$  nesta área (Bridges et al., 1987). A descoberta da interação antagônica entre os receptores  $A_{2A}/D_2$  levou à inferência de que um aumento na atividade dos receptores  $A_{2A}$  poderia ser relevante para o tratamento da esquizofrenia, onde a inibição da ação dos receptores  $D_2$  pode ser benéfica (Ferre, 1997, Dixon et al., 1999).

O excesso de efeitos colaterais é uma das maiores limitações do uso de antipsicóticos tradicionais, como o haloperidol, antagonista de receptores dopaminérgicos tipo  $D_2$ . De fato, vários estudos têm investigado as ações do haloperidol em funções cognitivas (Ploeger et al., 1992; Nowakowska et al., 1999, Gemperle et al., 2003) já que os

neurolépticos tradicionais costumam falhar na melhoria da performance cognitiva dos pacientes (Hagger et al., 1993; Sharma, 1999). Vários estudos têm sido realizados na tentativa de minimizar os efeitos colaterais de drogas como o haloperidol através de possíveis tratamentos adjuvantes (Akhondzadeh et al., 2000; Depoortere et al., 2003; M<sup>o</sup>-Puc et al., 2003).

## 1.6. OBJETIVOS

Considerando (1) a participação do sistema adenosinérgico no processamento da memória, (2) sua interação com diferentes sistemas de neurotransmissão, igualmente envolvidos no processamento da memória, bem como (3) seu papel na consolidação da memória no córtex cingulado posterior, o presente trabalho tem por objetivos:

1. Verificar o efeito da intra-infusão, no córtex cingulado posterior, de agonistas e antagonistas dos receptores de adenosina,  $A_1$  e  $A_{2A}$ , na evocação da memória de longa duração para a tarefa de esquiva inibitória.
2. Investigar o efeito da intra-infusão, no córtex cingulado posterior, de agonista e antagonista dos receptores de adenosina  $A_1$  na consolidação da memória de uma tarefa de aprendizado não-associativo.
3. Investigar a interação entre o sistema adenosinérgico e dopaminérgico em diferentes paradigmas comportamentais.
4. Verificar se possíveis efeitos prejudiciais do haloperidol, antagonista de receptores  $D_2$ , podem ser revertidos pela co-administração de cafeína, um antagonista não-seletivo de receptores de adenosina.

**CAPÍTULO I**

**A ativação de receptores de adenosina, no córtex cingulado posterior, prejudica a evocação da memória em ratos, na tarefa de esquiva inibitória.**





## Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex impairs memory retrieval in the rat

Grace Schenatto Pereira <sup>a,b,\*</sup>, Janine Inez Rossato <sup>a</sup>, João José Freitas Sarkis <sup>b</sup>,  
Martín Cammarota <sup>d</sup>, Carla Denise Bonan <sup>c</sup>, Iván Izquierdo <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Dr. Eduardo De Robertis", Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Received 30 September 2004; revised 15 December 2004; accepted 29 December 2004

### Abstract

Adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor agonists and antagonists have been reported to alter learning and memory. The aim of our study was to investigate the involvement of adenosinergic system in memory retrieval into posterior cingulate cortex (PCC) of Wistar rats. To clarify this question, we tested specific agonist and antagonists of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors in rats submitted to a one-trial inhibitory avoidance task. The stimulation of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors by CPA and CGS21680, respectively, impaired memory retrieval for inhibitory avoidance task, into PCC. These findings provide behavioral evidence for the role of adenosinergic system in the memory retrieval into PCC.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Adenosine A<sub>1</sub> receptor; Adenosine A<sub>2A</sub> receptor; Retrieval; Memory; Posterior cingulate cortex; Inhibitory avoidance task

### 1. Introduction

Adenosine is a neuromodulator (Dunwiddie & Masino, 2001), which acts through four types of receptor: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, and A<sub>3</sub>. A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> receptors inhibit neuronal activity through G<sub>i</sub> and G<sub>o</sub> proteins, while A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> act through stimulation of neuronal activity via G<sub>s</sub> protein (Klinger, Freissmuth, & Nanoff, 2002). Endogenous adenosine modulates long-term synaptic plasticity phenomena, such as long-term potentiation (LTP), long-term depression (LTD) and depotentiation (de Mendonça, Costenla, & Ribeiro, 2002). Adenosine A<sub>1</sub> receptor is highly expressed in brain cortex and hip-

pocampus, while A<sub>2A</sub> receptor is found in striato-pallidal GABAergic neurons, being expressed in lower levels in other brain regions (Ribeiro, Sebastião, & de Mendonça, 2003). Several studies have reported that adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor agonists and antagonists alter learning and memory (Corodimas & Tomita, 2001; Khavandgar, Homayoun, Torkaman-Boutorabi, & Zarrindast, 2001; Kopf, Melani, Pedata, & Pepeu, 1999; Normile & Barraco, 1991; Ohno & Watanabe, 1996).

The posterior cingulate cortex (PCC) is a neocortical region that projects to the parahippocampal formation and has reciprocal connections with the prefrontal cortex and the anterior thalamic nuclei (Maddock, 1999). Therefore, PCC is strategically located to mediate signals between these areas and may participate in hippocampal functions. PCC might also have a role in implementing emotional memory prioritization at an

\* Corresponding author. Fax: +55 51 3316 5538.

E-mail address: [graceschenatto@hotmail.com](mailto:graceschenatto@hotmail.com) (G.S. Pereira).

earlier processing stage (Maddock, 1999). Kubota and Gabriel (1995) postulated that the Papez circuit may have a comparator function, where incoming data are compared with stored data: if they are in accordance, already planned behavioral programs are executed; if not, outputs are generated that heighten attention and inhibit planned actions. Studies from our laboratory has been showed that memory consolidation in PCC is modulated by glutamatergic, GABAergic and adenosinergic system (Mello e Souza et al., 1999; Pereira et al., 2002; Souza et al., 2002).

Retrieval of one-trial inhibitory avoidance memory (IA) involves the participation of a large network of cortical regions including the entorhinal, posterior parietal, and anterior cingulate cortices (Barros et al., 2000). Pharmacological findings have shown that retrieval of IA memory requires glutamate receptors, cAMP-dependent protein kinase (PKA), and mitogen-activated protein kinases (MAPK) in the above-mentioned regions (Barros et al., 2000). Most of studies on the pharmacology of retrieval have been carried out in the hippocampus, which is involved in most declarative and episodic memories (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo & McGaugh, 2000). There are many studies demonstrating functional interconnections between the hippocampus and the amygdale (Suzuki, Wang, Edge, Mimaki, & Watson, 1999), entorhinal cortex and perirhinal cortex (Hyman, Van Hoesen, & Damasio, 1990) and many other areas of the cortex, including sensory and associative areas, the anterior and posterior cingulate cortex (Van Hoesen, 1985).

Since the role of PCC into memory retrieval remains unknown, and in view of the influence of adenosine receptors on memory consolidation, the present experiments were designs to identify the role of A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors in inhibitory avoidance memory retrieval in PCC.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats (3 months of age, 250–280 g of weight) from our own breeding stock were used. The animals were housed into plastic cages under a 12h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM), with water and Purina lab chow freely available and at a constant temperature of 23 °C. To deliver the pharmacological agents to be tested, rats were bilaterally implanted under deep thionembutal anesthesia with 27-gauge guides aimed to the posterior cingulate cortex in accordance to coordinates (A  $-5.8 \pm 1.0$ , V 2.8) taken from the atlas of Paxinos and Watson (Paxinos & Watson, 1986). Animals were allowed to recover for 4 days before submitting them to any other procedure. In all experiments the “Principles

of laboratory animal care” (NIH publication No. 85-23, revised 1996) were strictly followed.

### 2.2. Inhibitory avoidance task

After recovery from surgery, rats were trained in a one trial, step-down, inhibitory avoidance task (IA), a hippocampal-dependent, fear motivated learning paradigm much used for the biochemical analysis of memory formation (Bevilaqua et al., 1999; Cammarota, Bevilaqua, Kerr, Medina, & Izquierdo, 2003). In order to do that, animals were gently put on a 2.5 cm high, 7.0 cm wide wood platform placed inside and at the leftmost extreme of a 50 × 25 × 25 cm acrylic training box whose floor was made of a grid of parallel bronze bars spaced 1 cm apart. At the very moment the animal stepped down from the platform and put its four paws on the grid, it received a 0.5 mA, 2 s scrambled footshock. After that, it was immediately removed from the training box.

At the time of drug delivery, a 30-gauge cannula was tightly fitted into the implanted guide and linked by an acrylic tube to a microsyringe. Infusions (0.5 µl/side) were carried out over 30 s, first on the right and then on the left posterior cingulate cortex; the 30-gauge cannula was left in place for 15 additional seconds to minimize backflow. For experiments involving co-infusion of drugs, the final volume of the infusion was 0.5 µl/side. To evaluate memory retention, latency to step down onto the grid during the training session was compared to that obtained in a test session performed 24 h later. In the test session the procedure was identical to that used during training except that the electric foot-shock was omitted. Cannula placement was verified postmortem as described previously (Bonini, Rodrigues, Kerr, Bevilaqua, & Cammarotta, 2003). Briefly, 2–4 h after the behavioral test, 0.5 µl of a 4% methylene-blue solution were infused as described above and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as indicative of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal. Only data from animals with correct cannula implants were included in statistical analyses.

### 2.3. Open field and plus maze

To analyze exploratory and locomotor activities, animals were placed on the left rear quadrant of a 50 × 50 × 39 cm open field with black plywood walls and a brown floor divided into 12 equal squares. The number of line crossings and the number of rearings were measured over 5 min and taken as an indicative of locomotor and exploratory activities. To evaluate their anxiety state, rats were exposed to an elevated plus maze exactly as detailed in (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985). The total number of entries into the four arms, the number of entries and the time spent into the open arms were recorded over a 5 min session. It has been repeatedly

reported that confinement to the closed arms of an elevated plus maze is associated with the observation of significantly more anxiety-related behaviors than confinement to the open arms; moreover, anxiogenic drugs significantly reduce the percentage of entries into, and time spent on, the open arms (Pellow et al., 1985). Ten minutes before exposure to the open field or the plus maze, animals received bilateral 0.5  $\mu$ l infusions of vehicle or of the drug under scrutiny into the posterior cingulate cortex.

#### 2.4. Drugs

N6-cyclopentyladenosine (CPA) and 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX) were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA. 4-(2-[7-Amino-2-[2-furyl]-[1,2,4] triazol[2,3- $\alpha$ ][1,3,5]triazin-5-yl-amino]ethyl) phenol (ZM241385) and 2-[p-(2-carbonyl-ethyl)-phenylethylamino]-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (CGS21680) were obtained from Tocris, Ballwin, MO, USA. All drugs were dissolved in saline containing 2% DMSO.

#### 2.5. Statistical analysis

Data are reported as medians (interquartile range) of the step-down latencies during training and test sessions and were analyzed by Kruskal–Wallis or Mann–Whitney *U* tests as required.

Parametric statistics (ANOVA followed by post hoc Duncan multiple range test) were applied to plus maze measures and open field crossing or rearing values.

### 3. Results

To analyze the role of  $A_1$  receptors in the expression of the long-term memory (LTM) for the IA task, rats were trained in the mentioned paradigm and, 10 min before testing received bilateral 0.5  $\mu$ l infusions of vehicle, the  $A_1$  receptor antagonist, DPCPX (Bruns et al., 1987), or the  $A_1$  receptor agonist, CPA (Lohse et al., 1988), into the posterior cingulate cortex (PCC) (Fig. 1). DPCPX did not affect IA memory expression when given at a dose of 1, 50, and 100 nM (Fig. 2). Conversely, CPA significantly decreased test step-down latencies when infused at 1 nM ( $p < .001$ ), 50 nM ( $p < .001$ ), and 100 nM ( $p < .05$ ) (Fig. 3). To study the participation of  $A_{2A}$  receptors within PCC in IA memory retrieval, the  $A_{2A}$  receptor antagonist, ZM241385 (Poucher et al., 1995) or the  $A_{2A}$  receptor agonist, CGS21680 (Jarvis & Williams, 1989) were employed. ZM241385 did not alter IA memory retrieval at any dose (1, 50, and 100 nM) analyzed (Fig. 4). On the contrary, the intra-PCC infusion of CGS21680 induced an amnesic effect in all doses tested 1 nM ( $p < .05$ ), 50 nM ( $p < .05$ ), and 100 nM ( $p < .01$ ) (Fig. 5).

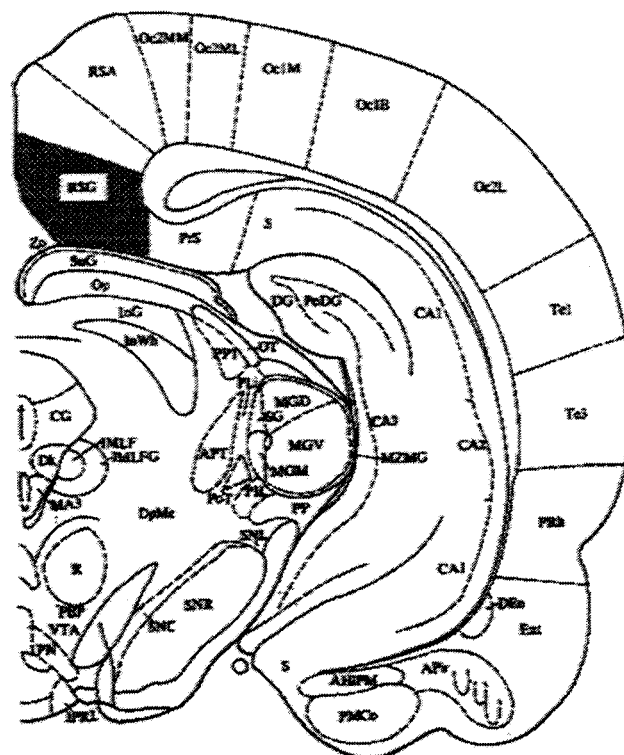


Fig. 1. Schematic drawing of the rat brain section at coronal plane A  $-0.58$  cm from the Atlas of Paxinos and Watson (1986) showing (stippled) the extension of the area reached by infusions into posterior cingulate cortex. The maximum extension reached by any individual infusion was less than 1 mm<sup>3</sup> in the animals with correct infusion placements.

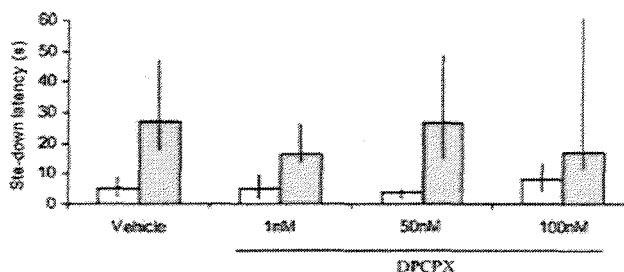


Fig. 2. Infusion of DPCPX into posterior cingulate cortex does not affect retrieval of inhibitory avoidance long-term memory. Rats bilaterally implanted with indwelling cannulae into PCC were trained in IA and tested for retention 24 h later. Ten minutes before that they received 0.5  $\mu$ l bilateral infusions of vehicle (2% DMSO in saline) or DPCPX (1, 50 or 100 nM). Data represent median (interquartile range) of the step-down latency time (i.e., the time spent on the training box platform before stepping down to the grid) during training (white bars) and test (gray bars) sessions and were analyzed using Kruskal–Wallis non-parametric test;  $n = 10$ –14 per group.

To rule out the possibility that the amnesic effect of intra-PCC CGS21680 was due to its action on  $A_1$  rather than  $A_{2A}$  receptors, we performed the co-administration intra-PCC of CGS21680 and DPCPX at a higher dose (100 nM). We also co-infused CPA and DPCPX into PCC in order to confirm the action of DPCPX on  $A_1$  receptors. DPCPX was unable to block the amnesic

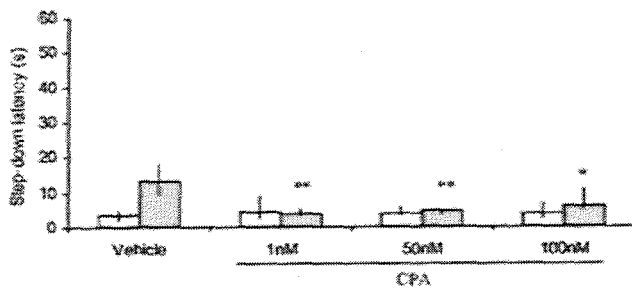


Fig. 3. Infusion of CPA into posterior cingulate cortex blocks retrieval of inhibitory avoidance long-term memory. Rats bilaterally implanted with indwelling cannulae into PCC were trained in IA and tested for retention 24 h later. Ten minutes before that they received 0.5  $\mu$ l bilateral infusions of vehicle (2% DMSO in saline) or CPA (1, 50 or 100 nM). Data represent median (interquartile range) of the step-down latency time (i.e., the time spent on the training box platform before stepping down to the grid) during training (white bars) and test (gray bars) sessions and were analyzed using Kruskal–Wallis non-parametric test;  $n = 10$ –14 per group. \* $p < .05$  and \*\* $p < .001$  with respect to vehicle (2% DMSO) in Mann–Whitney  $U$  test, two-tailed;  $n = 10$ –14 per group.

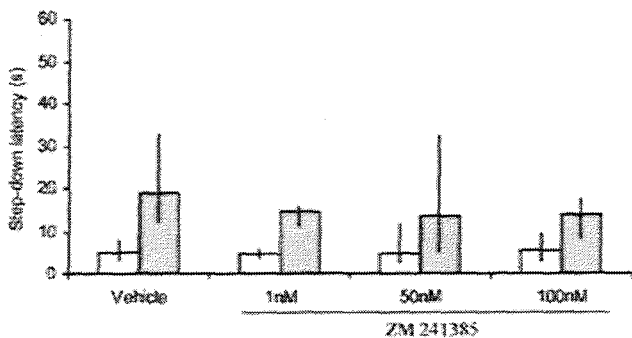


Fig. 4. Infusion of ZM241385 into posterior cingulate cortex does not affect retrieval of inhibitory avoidance long-term memory. Rats bilaterally implanted with indwelling cannulae into PCC were trained in IA and tested for retention 24 h later. Ten minutes before that they received 0.5  $\mu$ l bilateral infusions of vehicle (2% DMSO in saline) or ZM241385 (1, 50 or 100 nM). Data represent median (interquartile range) of the step-down latency time (i.e., the time spent on the training box platform before stepping down to the grid) during training (white bars) and test (gray bars) sessions and were analyzed using Kruskal–Wallis non-parametric test;  $n = 10$ –14 per group.

effect of CGS21680, demonstrating that the effect of CGS21680 was due to its action on  $A_{2A}$  receptor rather than  $A_1$  receptor. In contrast, DPCPX blocked the amnesic effect of CPA ( $p < .05$ ) (Fig. 6).

To further confirm the involvement of  $A_{2A}$  receptors on memory IA expression, we tested whether the  $A_{2A}$  receptor antagonist ZM241385 was able to counteract the retrieval deficit induced by the intra-PCC infusion of CGS21680. As can be seen in Fig. 7 when the ZM241385 (100 nM) was co-infused with CGS21680 (100 nM) 10 min before a memory retention session it completely reverse the amnesic effect of the  $A_{2A}$  agonist. Conversely, ZM241385 (100 nM) did not block the amnesic effect of CPA (100 nM; Fig. 7).

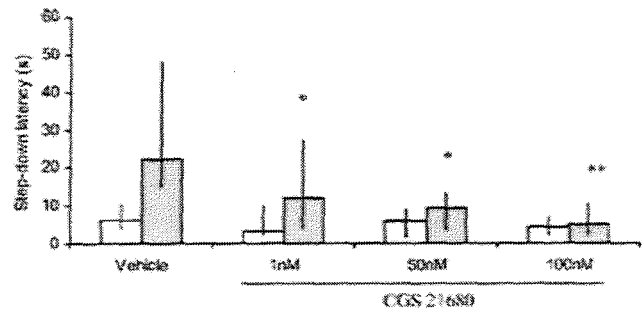


Fig. 5. Infusion of CGS21680 into posterior cingulate cortex blocks retrieval of inhibitory avoidance long-term memory. Rats bilaterally implanted with indwelling cannulae into PCC were trained in IA and tested for retention 24 h later. Ten minutes before that they received 0.5  $\mu$ l bilateral infusions of vehicle (2% DMSO in saline) or CGS21680 (1, 50 or 100 nM). Data represent median (interquartile range) of the step-down latency time (i.e., the time spent on the training box platform before stepping down to the grid) during training (white bars) and test (gray bars) sessions and were analyzed using Kruskal–Wallis non-parametric test;  $n = 10$ –14 per group. \* $p < .05$  and \*\* $p < .001$  with respect to vehicle (2% DMSO) in Mann–Whitney  $U$  test, two-tailed;  $n = 10$ –14 per group.

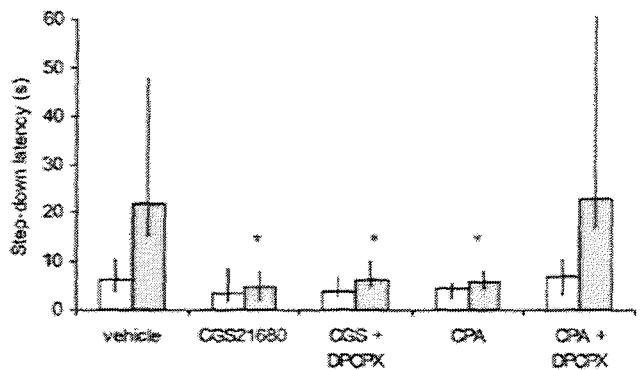


Fig. 6. Infusion of DPCPX into posterior cingulate cortex blocks the amnesic effect induced by CPA. Rats bilaterally implanted with indwelling cannulae into PCC were trained in IA and tested for retention 24 h later. Ten minutes before that they received 0.5  $\mu$ l bilateral infusions of vehicle (2% DMSO in saline), CGS21680 (100 nM), CGS21680 (100 nM) + DPCPX (100 nM), CPA (100 nM) or CPA (100 nM) + DPCPX (100 nM). Data represent median (interquartile range) of the step-down latency time (i.e., the time spent on the training box platform before stepping down to the grid) during training (white bars) and test (gray bars) sessions and were analyzed using Kruskal–Wallis non-parametric test;  $n = 10$ –14 per group. \* $p < .05$  with respect to vehicle (2% DMSO) in Mann–Whitney  $U$  test, two-tailed;  $n = 10$ –14 per group.

To evaluate whether CPA and CGS21680 have any consequence on locomotor activity or anxiety state when infused into PCC, we analyzed the effect of these drugs in the open field and elevated plus maze behavioral tasks. When infused into PCC 10 min before the behavioral session neither CPA (100 nM) nor CGS21680 (100 nM) modified the number of crossings [ $F(2, 17) = 1.059$ ,  $p = .369$ ] and rearings [ $F(2, 17) = 1.206$ ,  $p = .324$ ] in the open field or the number of entries into the open arms [ $F(2, 15) = 0.646$ ,  $p = .538$ ], into the closed arms [ $F(2, 15) = 2.019$ ,  $p = .167$ ] or the time spent into the

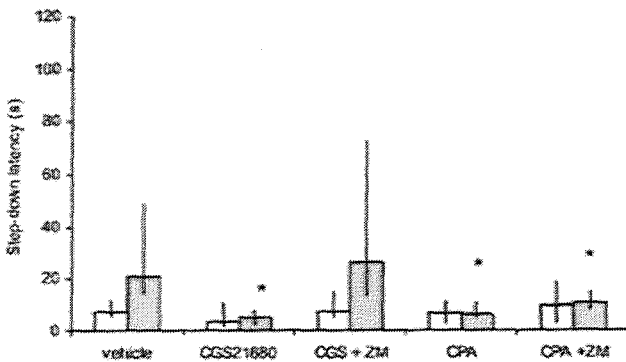


Fig. 7. Infusion of ZM241385 into posterior cingulate cortex blocks the amnesic effect induced by CGS21680. Rats bilaterally implanted with indwelling cannulae into PCC were trained in IA and tested for retention 24 h later. Ten minutes before that they received 0.5  $\mu$ l bilateral infusions of vehicle (2% DMSO in saline), CGS21680 (100 nM), CGS21680 (100 nM) + ZM241385 (100 nM), CPA (100 nM) or CPA (100 nM) + ZM241385 (100 nM). Data represent median (interquartile range) of the step-down latency time (i.e., the time spent on the training box platform before stepping down to the grid) during training (white bars) and test (gray bars) sessions and were analyzed using Kruskal–Wallis non-parametric test;  $n = 10$ –14 per group. \* $p < .05$  with respect to vehicle (2% DMSO) in Mann–Whitney  $U$  test, two-tailed;  $n = 10$ –14 per group.

open and closed arms [ $F(2, 15) = 1.032$ ,  $p = .380$ ] in an elevated plus maze.

#### 4. Discussion

Our data show that stimulation of adenosine  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors by CPA and CGS21680, respectively, impaired memory retrieval for inhibitory avoidance task in posterior cingulate cortex (PCC). Furthermore, the amnesic effect of CGS21680 in PCC was due to its action on  $A_{2A}$  receptors rather than  $A_1$  receptors.

In memory consolidation of IA task, CPA did not promote changes when infused into PCC (Pereira et al., 2002). However, in this study, CPA infusion promoted impairment of the retrieval. There are many studies demonstrating the role of adenosine  $A_1$  receptor in cognitive processes. CPA, administered intraperitoneally, disrupted the acquisition in two distinct tasks, contextual fear conditioning (Corodimas & Tomita, 2001) and passive avoidance (Normile & Barraco, 1991). The highly selective  $A_1$  receptor agonist, CHA, increased the number of errors in a working memory task (Ohno & Watanabe, 1996) and showed additive effects in restoring morphine-induced amnesia of passive avoidance (Khavandgar et al., 2001). In fact, the biochemical changes underlying consolidation are not identical to those of retrieval, although both processes might involve the same synapses (Barros, Izquierdo, Medina, & Izquierdo, 2003). If activation of  $A_1$  receptors at the time of consolidation was ineffective, why this activation impaired

retrieval? Studies from our laboratory demonstrated that AP5, a glutamate-NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) receptor antagonist, infused into the parietal or anterior cingulate cortex inhibit retrieval (Barros et al., 2000). Then, it is reasonable to suggest that NMDA receptor integrity is required to retrieval. The activation of  $A_1$  receptors promotes decrease of glutamate release (Dunwiddie & Haas, 1985) reduces NMDA receptor currents by a postsynaptic action (de Mendonça, Sebastião, & Ribeiro, 1995) and would, consequently, impair the memory retrieval. The effect of adenosine analogs administration such as, CPA, suggests that adenosine  $A_1$  receptors may modulate the memory retrieval when activated. However, it is important to observe that the infusion of DPCPX into PCC did not alter memory retrieval, demonstrating that, at least in basal condition, adenosine  $A_1$  receptors are not essential to retrieval in PCC.

Adenosine  $A_{2A}$  receptors are highly expressed in striatal medium-sized spiny neurons (Fink et al., 1992; Schiffmann, Libert, Vassart, & Vanderhaeghen, 1991) and play an important role in the control of motor behavior (Barraco, 1993; Brockwell & Beninger, 1996). Studies demonstrate that i.p. administration of adenosine  $A_{2A}$  receptor antagonist, SCH58261, facilitate retention of passive avoidance task when administered immediately but not 180 min later (Kopf et al., 1999). CGS21680 is 140 times more active at  $A_{2A}$  than at  $A_1$  receptors and exhibits very low activity at cloned  $A_{2B}$  and  $A_3$  receptors (Hutchison et al., 1989). There are several reports that CGS21680 exerts biological activity in brain structures outside the basal ganglia (Cunha, Johansson, Constantino, Sebastião, & Fredholm, 1996). In cortex and hippocampus and possibly other structures, CGS21680 very likely binds mainly to site different from the  $A_{2A}$  receptor (Johansson & Fredholm, 1989). In order to exclude the participation of  $A_1$  receptor in amnesic effects promoted by CGS21680 and DPCPX. Our results demonstrated that the effect of CGS21680 is due to its action in  $A_{2A}$  more than  $A_1$ . It has been shown that binding of [ $^3$ H]CGS21680 to rat cerebral cortex can be detected with autoradiography and that this binding shows somewhat different pharmacological characteristics than the binding of the drug to the striatum (Johansson, Georgiev, Parkinson, & Fredholm, 1993). Therefore, despite the low expression of  $A_{2A}$  receptors in cortical areas, it is possible to suggest that the activation of these receptors into PCC could be able to promote amnesic effect. Further studies are necessary to investigate if the participation of  $A_{2A}$  receptors is required in IA memory consolidation.

Molecular pharmacological data showed that biochemical changes underlying consolidation are similar to those of retrieval, but not all of the mechanisms involved in LTM consolidation are also crucial for retrieval (Barros et al., 2000, 2003; Izquierdo et al., 1997). Considering

that there are differences between consolidation and retrieval in hippocampus, entorhinal, parietal, and anterior cingulate cortices, it is acceptable that these distinctions exist into PCC. Imaging of activity-dependent genes revealed an involvement of parietal and retrosplenial cortices during consolidation of remote memory. Long-term memory storage was accompanied by synaptogenesis and laminar reorganization within some of these neocortical regions, concomitant with functional disengagement of the hippocampus and posterior cingulate cortices (Maviel, Durkin, Menzagui, & Bontempi, 2004).

Although, some of these points remain to be proven experimentally, it is hoped that the pharmacological findings presented in this study can provide a framework for development of hypotheses and strategies for future studies on the role of PCC and adenosinergic system in modulating memory retrieval.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPERGS, CNPq, and PRONEX.

#### References

- Barraco, R. A. (1993). Adenosine  $A_{2A}$  receptors in the nucleus accumbens mediate locomotor depression. *Brain Research Bulletin*, *31*, 397–404.
- Barros, D. M., Izquierdo, L. A., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of memory retrieval. *Current Drug Targets*, *2*, 81–94.
- Barros, D. M., Izquierdo, L. A., Mello e Souza, T., Ardenghi, P. G., Pereira, P., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2000). Molecular signaling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behavior Brain Research*, *114*, 183–192.
- Bevilaqua, L. R. M., Cammarota, M., Paratcha, G., de Stein, M. L., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1999). Experience-dependent increase in cAMP-responsive element binding protein in synaptic and nonsynaptic mitochondria of the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *11*, 3753–3756.
- Bonini, J. S., Rodrigues, L., Kerr, D. S., Bevilaqua, L. R. M., Cammarota, M., et al. (2003). AMPA/kainite and group I metabotropic receptor antagonists infused into different brain areas impair memory formation of inhibitory avoidance in rats. *Behaviour Pharmacology*, *14*, 161–166.
- Brockwell, N. T., & Beninger, R. J. (1996). The differential role  $A_1$  and  $A_2$  adenosine receptor subtypes in locomotor activity and place condition in rats. *Behavioral Pharmacology*, *7*, 373–383.
- Bruus, R. F., Fergus, J. H., Badger, E. W., Bristol, J. A., Santay, L. A., Hartaman, J. D., et al. (1987). Binding of the  $A_1$ -selective adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine to rat brain membranes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology*, *335*, 59–63.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Kerr, D. S., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *Journal of Neuroscience*, *23*, 737–741.
- Corodimas, K. P., & Tomita, H. (2001). Adenosine  $A_1$  receptor activation selectively impairs the acquisition of contextual fear conditioning in rats. *Behavior Neuroscience*, *115*(6), 1283–1290.
- Cunha, R. A., Johansson, B., Constantino, M. D., Sebastião, A. M., & Fredholm, B. B. (1996). Evidence for high-affinity binding sites for the adenosine  $A_{2A}$  receptor agonist [ $^3$ H]CGS21680 in the rat hippocampus and cerebral cortex that are different from striatal  $A_{2A}$  receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology*, *353*(3), 261–271.
- de Mendonça, A., Costenla, A. R., & Ribeiro, J. A. (2002). Persistence of the neuromodulatory effects of adenosine on synaptic transmission after long-term potentiation and long-term depression. *Brain Research*, *932*, 56–60.
- de Mendonça, J. A., Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (1995). Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampus neurons by adenosine  $A_1$  receptor activation. *Neuroreport*, *6*, 1097–1100.
- Dunwiddie, T. V., & Haas, H. L. (1985). Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *Journal of Physiology*, *369*, 365–377.
- Dunwiddie, T. V., & Masino, S. A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Review Neuroscience*, *24*, 31–55.
- Fink, J. S., Weaver, D. R., Rivkees, S. A., Peterfreund, R. A., Pollack, A. E., Adler, E. M., et al. (1992). Molecular cloning of the rat  $A_2$  adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Molecular Brain Research*, *14*, 186–190.
- Hutchison, A. J., Webb, R. L., Oei, H. H., Ghai, G. R., Zimmerman, M. B., & Williams, M. (1989). CGS21680C, an  $A_2$  selective adenosine receptor I agonist with preferential hypotensive activity. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, *251*, 47–55.
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., & Damasio, A. R. (1990). Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. *Neurology*, *40*, 1721–1730.
- Izquierdo, I., & McGaugh, J. L. (2000). Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural Pharmacology*, *11*, 517–534.
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, *68*, 285–316.
- Izquierdo, I., Quirifed, J. A., Zanatta, M. S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P. K., et al. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, the entorhinal cortex and the posterior parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience*, *9*, 786–793.
- Jarvis, M. F., & Williams, M. (1989). Direct autoradiographic localization of adenosine  $A_2$  receptors in the rat brain using the  $A_2$ -selective agonist [ $^3$ H]CGS21680. *European Journal of Pharmacology*, *168*, 243–246.
- Johansson, B., & Fredholm, B. B. (1989). Further characterization of the binding of the adenosine receptor agonist [ $^3$ H]CGS21680 rat brain using autoradiography. *Neuropharmacology*, *34*, 393–403.
- Johansson, B., Georgiev, V., Parkinson, F. E., & Fredholm, B. B. (1993). The binding of the adenosine  $A_2$  selective agonist [ $^3$ H]CGS21680 to rat cortex differs from its binding to rat striatum. *European Journal of Pharmacology Molecular Pharmacology Section*, *247*, 103–110.
- Khavandgar, S., Homayoun, H., Torkaman-Boutorabi, A., & Zarrindast, M. R. (2001). The effects of adenosine receptor agonists and antagonists on morphine state-dependent memory of passive avoidance. *Neurobiology of Learning and Memory*, *78*, 390–405.
- Klinger, M., Freissmuth, M., & Nanoff, C. (2002). Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cellular Signalling*, *14*, 99–108.
- Kopf, S. R., Melani, A., Pedata, F., & Pepeu, G. (1999). Adenosine and memory storage: effect of  $A_1$  and  $A_2$  receptor antagonist. *Psychopharmacology*, *146*, 214–219.

- Kubota, Y., & Gabriel, M. (1995). Studies of the limbic comparator: limbic circuit training-induced unit activity and avoidance behaviour in rabbits with anterior dorsal thalamic lesions. *Behavior Neuroscience*, *109*, 258–277.
- Lohse, M. J., Klotz, K. N., Schwabe, U., Cristalli, G., Vittori, S., & Grifantini, M. (1988). 2-Chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A<sub>1</sub> adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology*, *337*(6), 687–689.
- Maddock, R. J. (1999). The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain. *Trends in Neuroscience*, *22*, 310–316.
- Maviel, T., Durkin, T. P., Menzaghi, F., & Bontempi, B. (2004). Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science*, *305*, 96–99.
- Mello e Souza, T., Roesler, R., Madruga, M., de-Paris, F., Quevedo, J., Rodrigues, C., et al. (1999). Differential effects of post-training muscimol and AP5 infusions into different regions of the cingulate cortex on retention for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *72*, 118–127.
- Normile, H. J., & Barraco, R. A. (1991). N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A<sub>1</sub> receptors. *Brain Research Bulletin*, *27*(1), 101–104.
- Ohno, M., & Watanabe, S. (1996). Working memory failure by stimulation of hippocampal adenosine A<sub>1</sub> receptors in rats. *Neuroreport*, *7*, 3013–3016.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (2nd ed.). San Diego: Academic Press.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*, 149–167.
- Pereira, G. S., Melo e Souza, T., Vinadé, E. R. C., Choi, H., Rodrigues, C., Battastini, A. M. O., et al. (2002). Blockade of adenosine A<sub>1</sub> receptors in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, *437*(3), 151–154.
- Poucher, S. M., Keddie, J. R., Singh, P., Stoggall, S. M., Caulkett, P. W., Jones, G., et al. (1995). The in vitro pharmacology of ZM241385, a potent, non-xanthine A<sub>2A</sub> selective adenosine receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, *115*(6), 1096–1102.
- Ribeiro, J. A., Sebastião, A. M., & de Mendonça, A. (2003). Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspective*, *16*, 80–86.
- Schiffmann, S. N., Libert, F., Vassart, G., & Vanderhaeghen, J. J. (1991). Distribution of adenosine A<sub>2</sub> receptor mRNA in the human brain. *Neuroscience Letters*, *130*, 177–181.
- Souza, M. M., Mello e Souza, T., Vinadé, E. R., Rodrigues, C., Choi, H. K., Dedavid e Silva, T. L., et al. (2002). Effects of post-training treatments in the posterior cingulate cortex on short- and long-term memory for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *77*, 202–210.
- Suzuki, Y., Wang, L., Edge, J., Mimaki, T., & Walson, P. D. (1999). Anticonvulsant tolerance to clozapam in amygdala kindled rats: clonazepam concentrations and benzodiazepine receptor binding. *Neuropharmacology*, *33*, 869–874.
- Van Hoesen, G. W. (1985). Neural systems of the non-human primate forebrain implicated in memory. *Annual New York Academy Science*, *444*, 97–112.

## **CAPÍTULO II**

**Ativação de receptores de adenosina no córtex cingulado posterior de ratos são necessários para habituação a um novo ambiente.**

Este manuscrito está submetido à revista Neuroscience Letters.



Dear Mrs Pereira,

Your submission entitled "Adenosine A1 receptors from posterior cingulate cortex of rats are necessary for habituation to a novel environment." has been assigned the following manuscript number: NSL-05-34.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the

Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/nsl/>

Username: graceschenatto

Password: If you have forgotten your password, please click the "Forget your password?" link located on the log-in screen.

Thank you for submitting your work to Neuroscience Letters.

Kind regards,

Lauren Coartney  
Editorial Office  
Neuroscience Letters

**Adenosine A<sub>1</sub> receptors from posterior cingulate cortex of rats are necessary for habituation to a novel environment.**

Grace Schenatto Pereira<sup>1,2,\*</sup>, Rosane Souza da Silva<sup>2,3</sup>, João José Freitas Sarkis<sup>2</sup>, Carla Denise Bonan<sup>3</sup>, Iván Izquierdo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Memória and <sup>2</sup>Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

**\* Corresponding Author:**

Grace Schenatto Pereira, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2600, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: +55 51 3316 5530

FAX: + 55 51 3316 5538

E-mail address: [gsp\\_rs@hotmail.com](mailto:gsp_rs@hotmail.com)

## Abstract

One of the most elementary forms of learning is the habituation to a novel environment. Several studies have demonstrated that habituation is dependent of hippocampal activity, while there are few studies with respect to memory consolidation to habituation to an open field in other brain structures. Here, we investigate the role of posterior cingulate cortex (PCC) and adenosinergic system in habituation, through intra-PCC infusion of the adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist, N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine (CPA), and antagonist 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX). The stimulation of adenosine A<sub>1</sub> receptors by CPA into PCC did not influence the habituation to a novel environment as well as blockade of A<sub>1</sub> receptor by DPCPX at 100nM. DPCPX at 1 and 50nM was able to impaired the performance of animals in open field, increased the number of rearing when compared to vehicle group and these effects were not due to an increase in locomotor activity. These results indicate that PCC and adenosine A<sub>1</sub> receptors participate of memory consolidation to a novel environment in rat.

Key words: posterior cingulate cortex – habituation – adenosine receptors – memory

## 1. Introduction

One of the most elementary forms of learning is the habituation to a novel environment, in which the decreased exploration as a function of repeated exposure to the same environment is taken as an index of memory [11]. Several studies have demonstrated that habituation is dependent of hippocampal activity [3, 4, 20, 21]. Nevertheless, there are few studies about the pharmacological and biochemical mechanisms of memory consolidation for habituation to an open field in other brain structures.

The cingulate cortex is not an anatomically homogeneous region but rather can be subdivided into anterior and posterior components [1, 2, 32], which can be distinguished on the basis of their connectivity as well as their cytoarchitecture. Connections of the posterior cingulate cortex (PCC, Brodmann areas 23 and 29) include thalamic nuclei, hippocampal formation and posterior association cortices [1, 2, 7, 27]. Therefore, PCC is strategically located to mediate signals between these areas and may participate in hippocampal functions. It has been proposed that as a result of the extensive reciprocal connections between PCC and parahippocampal cortices, the PCC has an important part in analyzing the significance of objects within a topographical representation and in passing on this representation to the hippocampal system for memory formation [5]. PCC might also have a role in implementing emotional memory prioritization at an earlier processing stage [27]. Studies from our laboratory has been shown that memory consolidation, in PCC, to an inhibitory avoidance task is modulated by glutamatergic, GABAergic and adenosinergic system [31, 19, 10].

Adenosine modulates synaptic plasticity through four different receptors: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub>. A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> receptors inhibit neuronal activity through G<sub>i</sub> and G<sub>o</sub> protein, while A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> act through stimulation of neuronal activity via G<sub>s</sub> protein [15]. It has been demonstrated that adenosinergic system participates in different behavioral tasks, such as step-through and step-down inhibitory avoidance tasks [30, 10], investigatory behavior [13], Morris water maze [17] and three-panel runway task [16]. However, there are no studies with respect to

adenosinergic system functions on habituation, although the adenosine plays an important role in neuromodulation of synaptic transmission.

In the present work, we used the intra-PCC infusions of adenosine A<sub>1</sub> receptors analogs to evaluate the role of this receptor in habituation to a novel environment.

## 2. Materials and methods

*Drugs:* N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine (CPA), an agonist of adenosine A<sub>1</sub> receptors [18] and 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX) [25], an antagonist of adenosine A<sub>1</sub> receptors were purchased from Sigma, St Louis, MO, USA. All drugs were dissolved in saline containing 2 % DMSO.

*Animals:* Male Wistar rats (3 months of age, 250-280 g of weight) from our own breeding stock were used. The animals were housed into plastic cages under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM), with water and Purina lab chow freely available and at a constant temperature of 23°C. To deliver the pharmacological agents to be tested, rats were bilaterally implanted under deep thionembutal anesthesia with 27-gauge guides aimed to the posterior cingulate cortex in accordance to coordinates (A -5.8 L ±1.0, V 2.8) taken from the atlas of Paxinos and Watson [8]. Animals were allowed to recover for 4 days before submitting them to any other procedure. In all experiments the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication N° 80-23, revised 1996) were strictly followed. Cannula placement was verified postmortem as described previously (Bonini et al., 2003). Briefly, 2-4 h after the behavioral test, 0.5 µl of a 4% methylene-blue solution were infused as described above and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as indicative of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal. Only data from animals with correct cannula implants were included in statistical analyse.

*Habituation task:* After recovery from surgery, animals were exposed to a novel environment. This was a 50 x 50 x 39 cm open field with black plywood

walls and a brown floor divided into 12 equal squares. Animals were gently placed on the left rear quadrant. The number of line crossings and rearings [11] were measured over 5 min periods (training session). Immediately after exposure to the open field, animals received an infusion into PCC. Both the adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist and antagonist, CPA and DPCPX, respectively, were infused at following concentrations: 1, 50 and 100nM. At the time of drug delivery, a 30-gauge cannula was tightly fitted into the implanted guide and linked by an acrylic tube to a microsyringe. Infusions (0.5 µl/side) were carried out over 30 s, first on the right and then on the left posterior cingulate cortex; the 30-gauge cannula was left in place for 15 additional seconds to minimize backflow. Twenty four hours latter, the animals were placed again in the same apparatus and the number of crossing and rearing were measured (test session).

*Locomotor activity assessment:* animals received an intra-PPC infusion of DPCPX (1 and 50 nM) or vehicle (2%DMSO) and twenty four hours latter the locomotor activity was recorded during the following 60 min. Animals were allocated to individual black wooden boxes (50 cm X 30 cm X 30 cm, 50 cm high) placed on the floor of a soundproof and diffusely illuminated room. Motor activity of eight rats was recorded simultaneously by a videocomputerized system, with image analysis at four frames per second. The software tracked the animals by distinguishing their white color from the black background of the floor, registering X and Y horizontal coordinates [22].

*Statistical analysis:* Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) using the Duncan test for comparison among groups and paired simple test for training-test performance within each group. Comparisons between locomotor activities at different time points were analyzed using General Linear Model (GLM) repeated measure (drug treatment versus time) with time as the repeated measure. Duncan's post-hoc was used to determine the differences between specific groups. A value of  $P < 0,05$  was considered significant.

### 3. Results

There was evidence for habituation in groups which received the intra-PCC infusion of CPA in all concentrations tested (1, 50 and 100 nM) and DPCPX at 100 nM. In these groups, all training-test differences in crossings and rearings were significant by sample-paired test ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1 and 2).

Long-term memory habituation to a 5-min exposure to a novel environment was blocked by the immediate post-training bilateral infusion into PCC of DPCPX (1 and 50 nM) (Fig.1). However, the same groups had the number of rearings increased when compared to vehicle group (Fig.2). Since these effects could be due to an increased locomotion, we examined the effect of these doses of DPCPX on locomotor activity. There was no difference in locomotion of animals that received intra-PCC infusion of DPCPX at 1 and 50nM, when compared to vehicle group (Fig.3). Therefore, the effect of DPCPX on habituation to an open field was due mnemonic components rather than an increase in locomotor activity.

### 4. Discussion

The present data show that stimulation of adenosine  $A_1$  receptors by CPA into PCC does not influence the habituation to a novel environment; however, blockade of adenosine  $A_1$  receptor by DPCPX at 100nM. DPCPX, at 1 and 50nM, was able to impair the performance of animals in open field, increased the number of rearings when compared to vehicle group and these effects were not due to an increase in locomotor activity.

According to various behavioral, electrophysiological and clinical studies, the cingulate cortex is widely thought to be involved in regulation of emotional life, reactivity to painful stimuli, memory processing and attention to sensory stimuli [26, 28, 23, 14, 6]. The detection of novelty depends on the activation of a distributed network involving the hippocampus [29] and is a memory-dependent process, because the novel stimulus must be compared with stored information

to judge its novelty. The habituation to novelty (the novel environment, in the present experiment) involves, of course, a memory process [20, 21]. It has been suggested that the PCC plays a specific role in spatial learning essentially because this region of neocortex has a role in analyzing the significance of the objects and in passing on this representation to the hippocampal system [5, 6]. Then, pharmacological interferences in the PCC could result in altered responses in the habituation to a novel environment.

Previous studies from our laboratory have shown that the intra-PCC infusion of DPCPX was able to enhance the long-term memory retention in inhibitory avoidance task [10]. Such results indicate that adenosine A<sub>1</sub> receptors modulate the memory consolidation to an associative learning task. However, the present findings indicate that memory consolidation for habituation requires the functionality of adenosine A<sub>1</sub> receptors in the PCC, since that blockade of these receptors impairs that process.

Therefore, the present data suggest that the participation of adenosinergic system in the early period of consolidation of habituation must be different from that of the avoidance task. Memory formation for habituation differs not only from one-trial avoidance, but also from contextual fear, spatial learning and other associative learning tasks in different species [24, 9, 20]. This idea is corroborated by Vianna et al. (2001) [21] who demonstrated that glutamate NMDA receptors and protein kinase A present opposite effects in associative and nonassociative learning tasks. More detailed studies about the biochemistry of habituation are desirable.

In conclusion, this study reported the first evidence for the involvement of PCC in the memory processing for habituation to a novel environment in rat. Furthermore, the adenosine A<sub>1</sub> receptors seem to be essential for memory consolidation this nonassociative learning task, presenting an opposite role in associative learning task. These results reinforce the idea that different neural mechanisms are involved in memory formation of associative and nonassociative memories not only in hippocampus, but also in PCC.



## Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPERGS, CNPq and PRONEX.

## References

- [1] B.A. Vogt, Cingulate cortex. In: A. Peters, E.A. Jones (Eds.), *Cerebral Cortex*. Plenum, New York, 1985, pp. 89-149.
- [2] B.A. Vogt, Structural organization of cingulate cortex: Area, neurons and somatodendritic transmitter receptors. In: B.A. Vgt, M. Gabriel (Eds.), *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus*. Birkhauser, Boston, 1993, pp. 19-70.
- [3] C.M. Thiel, J.P.Huston, R.J.K. Schwarting, Hippocampal acetylcholine and habituation learning, *Neuroscience* 85 (1998) 1253-1262.
- [4] C.M. Thiel, C.P. Müller, J.P. Huston, R.J.K. Schwarting, High versus low reactivity to a novel environment: behavioural pahamacology and neurochemical assessments, *Neuroscience* 93 (1999) 243-251.
- [5] D.N. Pandya, E.H. Yeterian, Proposed neural circuitary for spatial memory in the primate brain, *Neuropsychologia* 22 (1984) 109-122.
- [6] E.C. Warburton, J.P. Aggleton, J.L. Muir, Comparing the effects of selective cingulate cortex lesions and cingulum bundle lesions on water maze performance by rats, *European Journal of Neuroscience* 10 (1998) 622-634.
- [7] F.H. Lopez da Silva, M.P. Witter, P.H. Boeijinga, A.H.M. Lohman, Anatomic organization and physiology of the limbic cortex, *Psychology Review* 70 (1990) 453-511.
- [8] G. Paxinos, C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates* (2<sup>nd</sup> ed.). San Diego: Academic Press, 1986.
- [9] G.E. Schafe, N.V. Nadel, G.M. Sullivan, A. Harris, J.E. LeDoux, Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent upon protein synthesis, PKA and MAP kinase, *Learning and Memory* 6 (1999) 97-110.

- [10] G.S. Pereira, T. Mello e Souza, E.R.C. Vinadé, H. Choi, C. Rodrigues, A.M.O. Battastini, I. Izquierdo, J.J.F. Sarkis, Blockade of adenosine A<sub>1</sub> receptors in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats, *European Journal of Pharmacology* 437 (2002) 151-154.
- [11] I. Izquierdo, N. Schröder, C.A. Netto, J.H. Medina, Novelty causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance in rats through NMDA receptor and CaMKII-dependent mechanisms in hippocampus, *European Journal of Neuroscience* 11 (1999) 3323-3328.
- [12] J.S. Bonini, L. Rodrigues, D.S. Kerr, L.R.M. Bevilaqua, M. Cammarotta, I. Izquierdo, AMPA/kainite and group I metabotropic receptor antagonists infused into different brain areas impair memory formation of inhibitory avoidance in rats, *Behaviour Pharmacology* 14 (2003) 161-166.
- [13] L. Meyer, J. Caston, Stress alters caffeine action on investigatory behaviour and behavioural inhibition in the mouse, *Behavioural Brain Research* 149 (2004) 87-93.
- [14] L.J. Vogt, L.J. Sim-Selley, S.R. Childers, R.G. Wiley, B.A. Vogt, Colocalization of  $\mu$ -opioid receptors and activated G-proteins in rat cingulate cortex, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299 (2001) 840-848.
- [15] M. Klinger, M. Freissmuth, C. Nanoff, Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins, *Cellular Signaling* 14 (2002) 99-108.
- [16] M. Ohno, S. Watanabe, Working memory failure by stimulation of hippocampal adenosine A<sub>1</sub> receptors in rats, *Neuroreport* 7 (1996) 3013-3016.
- [17] M.E.M. Angelucci, C. Cesário, R.H. Hiroi, P.L. Rosalen, C. da Cunha, Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35 (2002) 1201-1208.
- [18] M.J. Lohse, K.N. Klotz, U. Schwabe, G. Cristalli, S. Vittori, M. Grifantini, 2-chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A<sub>1</sub> adenosine

receptors, *Naunyn Schimiedebergs Archives Pharmacology* 337(6) (1988) 687-689.

[19] M.M. Souza, T. Mello e Souza, E.R. Vinadé, C. Rodrigues, H.K. Choi, T.L. Dedavid e Silva, J.H. Medina, I. Izquierdo, I., Effects of post-training treatments in the posterior cingulate cortex on short- and long-term memory for inhibitory avoidance in rats, *Neurobiology of Learning and Memory* 77 (2002) 202-210.

[20] M.R.M. Vianna, M. Alonso, H. Viola, J. Quevedo, F. de Paris, M. Furman, M.L. de Stein, J.H. Medina, I. Izquierdo, Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat, *Learning and Memory* 7 (2000) 333-340.

[21] M.R.M. Vianna, L.A. Izquierdo, D.M. Barros, M.M. Souza, C. Rodrigues, M.K. Sant'Anna, J.H. Medina, I. Izquierdo, Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34 (2001) 233-240.

[22] O.P. Dall'igna, A.L. da Silva, M.O. Dietrich, A. Hoffmann, R.V. de Oliveira, D.O. Souza, D.R. Lara, Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice, *Psychopharmacology* 166 (2003) 258-263.

[23] P.J. Nestor, T.D. Fryer, M. Ikeda, J.R. Hodges, Retrosplenial cortex (BA 29/30) hypometabolism in mild cognitive impairment (prodromal Alzheimer's disease), *European Journal of Neuroscience* 18 (2003) 2663-2667.

[24] R. Bourchouladze, T. Abel, N. Berman N. Berman, R. Gordon, K. Lapidus, E.R. Kandel, Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA, *Learning and Memory* 5 (1998) 365-374.

[25] R.F. Bruns, J.H. Fergus, E.W. Badger, J.A. Bristol, L.A. Santay, J.D. Hartaman, S.J. Hays, C.C. Huang, Binding of the A<sub>1</sub>-selective adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine to rat brain membranes, *Naunyn Schimiedebergs Archives Pharmacology* 335 (1987) 59-63.

- [26] R.G. Pay, Control of complex conation and emotional in the neocortex by the limbic entorhinal, subicular and cingulate cortices and hypothalamus, mammillary body, and thalamus, *International Journal of Neuroscience* 15 (1981) 1-30.
- [27] R.J. Maddock, The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain, *Trends in Neuroscience* 22 (1999) 310-316.
- [28] R.J. Maddock, A.S. Garret, M.H. Buonocore, Posterior cingulate cortex activation by emotional words: fMRI evidence from a valence decision task, *Human Brain Mapp* 18 (2003) 30-41.
- [29] R.T. Knight, T. Nakata, Cortiço-limbic circuits and novelty: A review of EEG and blood flow data, *Review Neuroscience* 9 (1998) 57-70.
- [30] S.R., Kopf, A. Melani, F. Pedata, G. Pepeu, Adenosine and memory storage: effect of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptor antagonist, *Psychopharmacology* 146 (1999) 214-219.
- [31] T. Mello e Souza, R. Roesler, M. Madruga, F. de-Paris, J. Quevedo, C. Rodrigues, M.K. Sant'Anna, J.H. Medina, I. Izquierdo, I., Differential effects of post-training muscimol and AP5 infusions into different regions of the cingulate cortex on retention for inhibitory avoidance in rats, *Neurobiology of Learning and Memory* 72 (1999) 118-127.
- [32] T. Van Groen, B.A. Vogt, J.M. Wyss, Interconnections between the thalamus and retrosplenial cortex in the rodent brain. In: B.A. Vogt, M. Gabriel (Eds.), *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus*. Birkhauser, Boston, 1993, pp. 123-150.

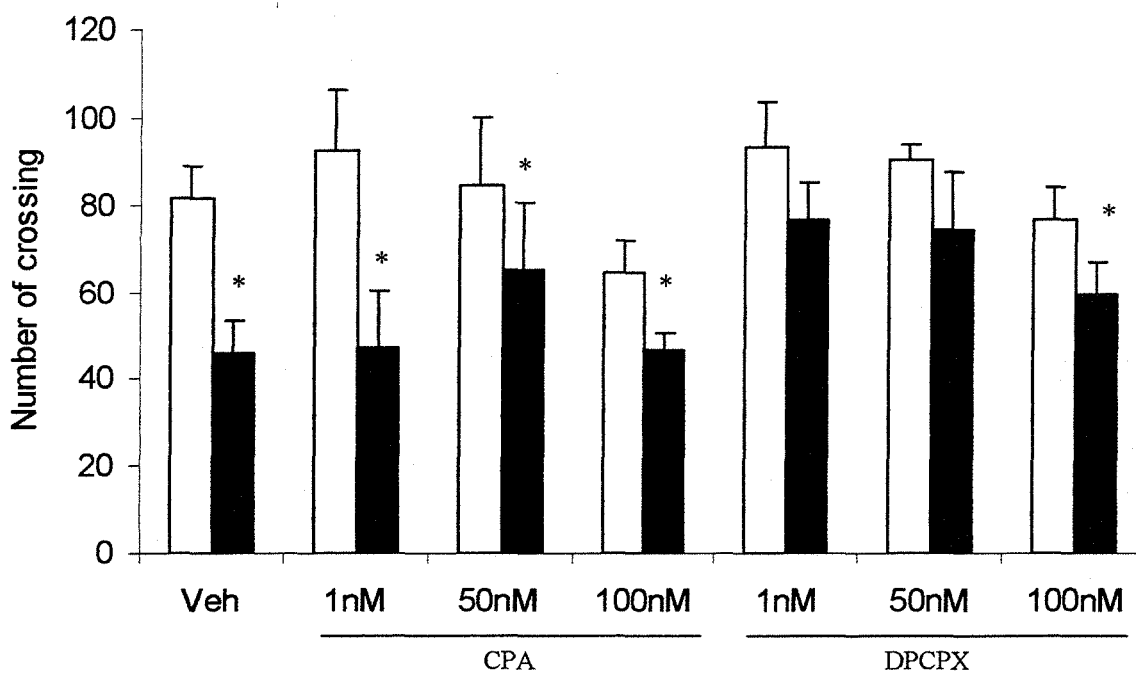


Figure 1 Effect of immediate post-training intra-PCC infusions of CPA and DPCPX on retention of spatial habituation in rats. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of crossings of training (white bars) and test (black bars) session performance in an open field with 24-h interval between sessions.  $n = 10-16$  animals per group. \* indicates that training-test differences were statistical significance ( $P < 0.01$ ).

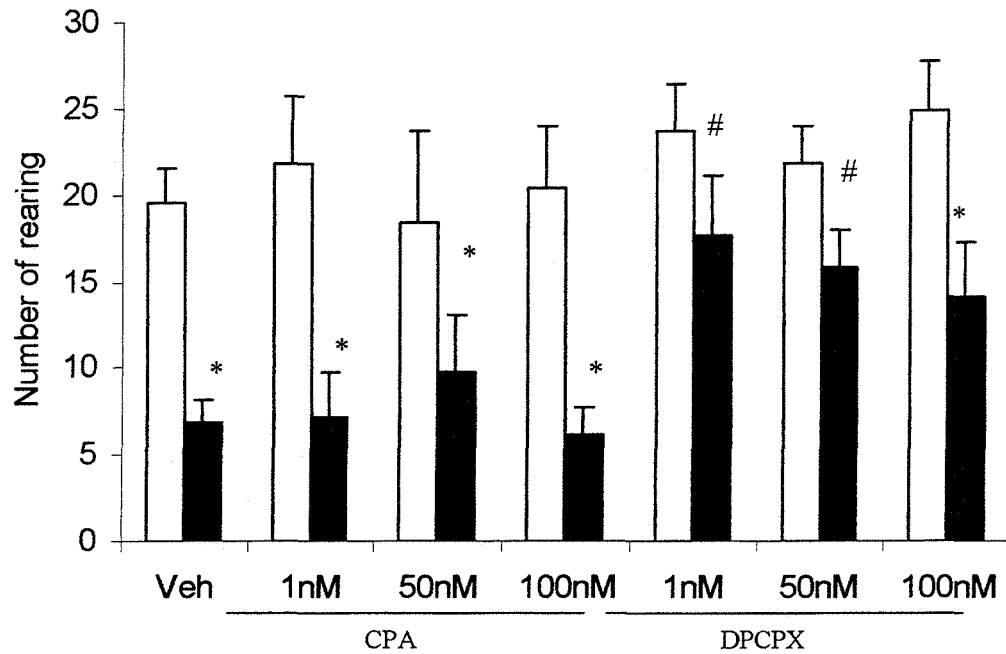


Figure 2 Effect of immediate post-training intra-PCC infusions of CPA and DPCPX on retention spatial habituation in rats. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of rearing of training (white bars) and test (black bars) session performance in an open field with 24-h interval between sessions.  $n = 10-16$  animals per group. \* indicates that training-test differences were statistical significance ( $P < 0.01$ ). # indicates statistical differences from vehicle group.

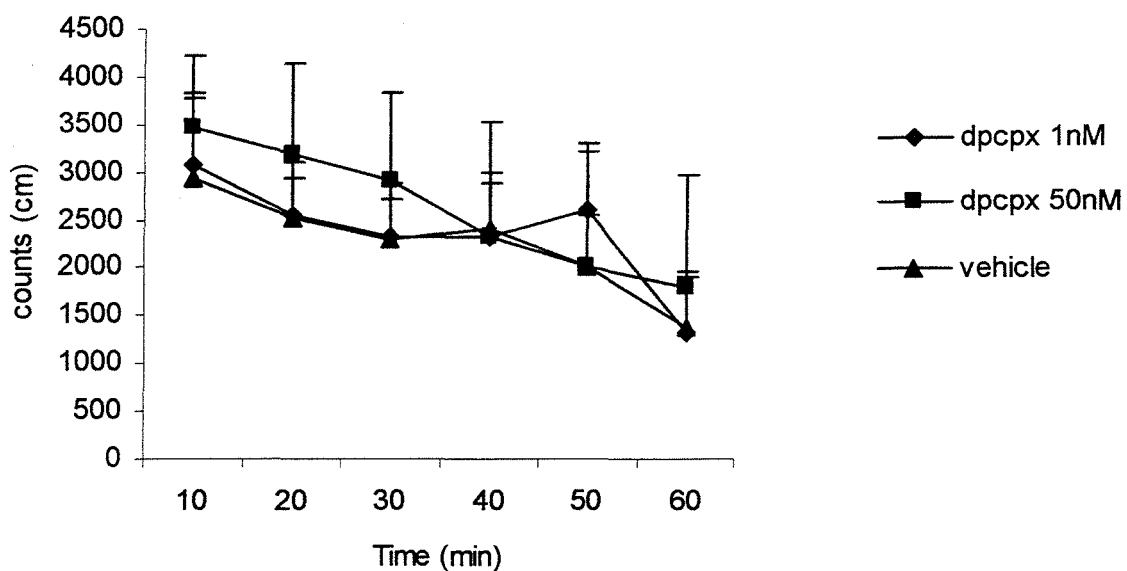


Figure 3 Effect of immediate post intra-PCC infusions of DPCPX on spontaneous locomotor activity of rats, 24h after the administration of intra-PCC infusion of DPCPX (1 and 50nM) or vehicle (DMSO2%). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of counts. n = 06-10 animals per group.

### **CAPÍTULO III**

#### **Interação entre cafeína e haloperidol em diferentes paradigmas comportamentais**

Este manuscrito será submetido à revista *Pharmacology, Biochemistry and Behavioral*.



### **Interaction between caffeine and haloperidol in different behavioral paradigms**

Grace Schenatto Pereira<sup>1,2,\*</sup>, Janine Inez Rosssato<sup>1</sup>, Cristiane Regina Guerino Furini<sup>1</sup>,  
Cristina Ribas Fürstenau<sup>2</sup>, João José Freitas Sarkis<sup>2</sup>, Carla Denise Bonan<sup>3</sup>, Martín  
Cammarota<sup>1</sup>, Iván Izquierdo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Memória and <sup>2</sup>Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica,  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto  
Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas,  
Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto  
Alegre, RS, Brasil.

\* Corresponding Author:

Grace Schenatto Pereira, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2600, CEP 90035-  
003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: +55 51 3316 5531

FAX: + 55 51 3316 5538

E-mail address: [gsp\\_rs@hotmail.com](mailto:gsp_rs@hotmail.com)

**Abstract**

The present study was aimed at characterizing some relevant aspects of the behavioral effects of caffeine and haloperidol, as well as the interaction of adenosine/dopamine on different behavioral paradigms. Our results demonstrate that caffeine was able to blockade the haloperidol effect on locomotion and inhibitory avoidance task. In the other hand, haloperidol abolished the caffeine effect to increase the anxiety behavior in the plus maze. In a Morris water maze, a task that measured spatial memory, we did not observe the caffeine/haloperidol interactions. Altogether, these considerations have led to the hypothesis that an association between caffeine/haloperidol could represent a new therapeutic approach for the treatment of schizophrenia with respect to cognitive deficits and locomotor activity.

Keywords: caffeine, haloperidol, behavioral, memory.

## 1. Introduction

Caffeine is widely consumed by humans in variety of foods, beverages and over-the-counter medicines (Nehlig et al., 1992; Fredholm et al., 1999). The psycho stimulant properties of caffeine are due to its ability to interact with neurotransmission in different regions of the brain, thereby promoting behavioral functions, such as vigilance, attention, mood and arousal (reviewed by Fisone et al., 2004). It is well established that under normal physiological conditions, the effects exerted in the brain, by caffeine, depends on its ability to act as an antagonist of adenosine receptors (Fredholm et al., 1999). Adenosine, a neuromodulator in central nervous system (CNS), can act on four types of G protein-coupled receptors: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub>. A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> receptors inhibit, while A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> stimulate adenylate cyclase/cAMP/PKA pathway (Reviewed by Ribeiro et al., 2003). Under physiological conditions, caffeine acts on A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors rather than A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub> because the affinity of these receptors for adenosine is low in the brain (Dunwiddie and Masino, 2001; Jacobson, 1998; Feoktsov and Biaggioni, 1997).

Caffeine has well-documented effects on dopaminergic transmission and this actions is exerted mainly via adenosine A<sub>2A</sub> receptors. Activation of A<sub>2A</sub> receptors has been shown to decrease the affinity of dopamine for D<sub>2</sub> receptors (Ferré et al., 1991). In fact, it exists an anatomical basis for the functional interactions between adenosine A<sub>1</sub>/dopamine D<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub>/ D<sub>2</sub> receptors in the same neurons. Selective A<sub>1</sub> agonists affect negatively the high affinity binding of D<sub>1</sub> receptors. Activation of A<sub>2A</sub> receptors leads to a decrease in D<sub>2</sub> receptors affinity for dopaminergic agonists. Adenosine/dopamine interactions at the behavioral level probably reflect those found at the level of dopamine receptor binding and signal transduction (Franco et al., 2000; Fredholm and Svenningsson, 2003).

Many neuroleptic drugs used in the treatment of schizophrenia and other psychotic disorders act as antagonists at dopamine D<sub>2</sub>-receptors. Cognitive dysfunction is recognized as a primary and pervasive deficit of schizophrenia (Friedman et al., 1999; Sharma, 1999) spanning a wide range of cognitive functions such as, verbal fluency, learning and memory, and attention (Kenny and Meltzer, 1991). In the majority of clinical studies addressing cognitive function of schizophrenic patients, conventional neuroleptic drugs failed to improve various cognitive domains (Hagger et al., 1993, Sharma 1999). It has been hypothesized that schizophrenic would have high caffeine intakes given that activation of A<sub>2A</sub> receptor makes dopamine less efficient as a neurotransmitter and, by blocking this receptor, caffeine enhances the ability of dopamine to function as a neurotransmitter (Ferré et al., 1991; Hughes et al., 1998).

The aim of the present study was to characterize some relevant aspects of the behavioral effects of caffeine and haloperidol, as well as the interaction between adenosine and dopamine on different behavioral paradigms.

## **2. Materials and methods**

*Animals:* Male Wistar rats (3 months of age, 250-280 g of weight) from our own breeding stock were used. The animals were housed into plastic cages under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM), with water and Purina lab chow freely available and at a constant temperature of 23°C. In all experiments the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication N° 85-23, revised 1996) were strictly followed.

*Drugs:* Caffeine was purchased from Research Biochemical International (RBI), Natick, MA, USA. Haloperidol was obtained from Sigma, St. Louis, MO, USA. All drugs were dissolved in 4 % DMSO in saline.

*Inhibitory avoidance task:* rats were trained in a one trial, step-down, inhibitory avoidance task (IA), a hippocampal-dependent, fear motivated learning paradigm much used for the biochemical analysis of memory formation (Bevilaqua et al., 1999; Cammarota et al., 2003). In order to do that, animals were gently put on a 2.5 cm high, 7.0 cm wide wood platform placed inside and at the leftmost extreme of a 50 x 25 x 25 cm acrylic training box whose floor was made of a grid of parallel bronze bars spaced 1 cm apart. At the very moment the animal stepped down from the platform and put its four paws on the grid, it received a 0.5mA, 2 sec scrambled foot-shock. After that, it was immediately removed from the training box. To evaluate memory retention, latency to step down onto the grid during the training session was compared to that obtained in a retention test session performed 24 h later. In the retention test session the procedure was identical to that used during training except that the electric foot-shock was omitted. Thirty minutes before the retention test session, animals received i.p injections of vehicle, caffeine (1 mg/Kg) and/or haloperidol (0.01 mg/Kg)

*Open Field:* To analyze exploratory and locomotor activities, animals were placed on the left rear quadrant of a 50 x 50 x 39 cm open field with black plywood walls and a brown floor divided into 12 equal squares. The number of line crossings and the number of rearing were measured over 5 min and taken as an indicative of locomotor and exploratory activities. Thirty minutes before exposure to the open field, animals received i.p injections of vehicle, caffeine (1 or 3 mg/Kg) and/or haloperidol (0.01; 0.1 or 0.2 mg/Kg)

*Plus Maze:* To evaluate their anxiety state, rats were exposed to an elevated plus maze exactly as detailed in (Pellow et al., 1985). The total number of entries into the four arms as well as the number of entries and the time spent into the open arms was recorded over a 5 min session. It has been repeatedly reported that confinement to the closed arms of an elevated plus maze is associated with the observation of significantly more anxiety-related behaviors than confinement to the open arms; moreover, anxiogenic drugs significantly reduce the percentage of entries into, and time spent on, the open arms (Pellow et al. 1985). Thirty minutes before exposure to the elevated plus maze, animals received i.p injections of vehicle, caffeine (1 mg/Kg) and/or haloperidol (0.01 mg/Kg)

*Morris Water Maze:* A modification of the spatial version of the water maze task described by Morris et al., 1982, was used. The water maze consisted of a black round tank 2 m in diameter and 0.8 m deep, filled with water. The water temperature was maintained at 22°C. A platform (12 cm) submerged 2 cm under the water surface was placed on the Norwest quadrant and maintained in the same position throughout the training sessions. Several visual cues were placed on the walls of the water maze room. During the experiments, the tank was videotaped and the scores for latency to escape to the platform from the starting point to the platform were counted. Each training sessions, one per day during five consecutive days, consisted of eight trials during which the animals were release in the tank facing the wall and allowed to swim freely to the escape platform. If the animal did not find the platform in 60 s it was gently guided to it. The animal was allowed to remain on the platform for 30 s before being removed from the tank, allowed to rest for 30 sec in it home cage and placed at the next starting point in the tank. The starting point was varied in a pseudo-randomized manner. Memory retention was evaluated in a 60 sec probe test session carried out 24 hs after the last training session. The probe test was

identical to the training sessions except that the platform was absent. The percentage of time spent on the goal quadrant was taken as a measure of memory retention. Thirty minutes before the probe test animals received i.p injections of vehicle, caffeine (1 mg/Kg) and/or haloperidol (0.01 mg/Kg)

*Statistical analysis:* To analyze the results of inhibitory avoidance task, we used parametric statistics when comparing groups in the training session, where latencies may be presumed to have a normal distribution. In this case, there was no difference among groups in the training session. In test sessions, distribution was not normal by definition: there was a 180-s latency ceiling. Thus, retention test data are reported as medians (interquartile range) of retention scores of all test sessions, and non-parametric statistics were applied (a Kruskal-Wallis ANOVA followed by individual Mann-Whitney U test, two-tailed).

Parametric statistics (ANOVA) followed by post-hoc Tukey multiple range test were applied to plus maze, water maze measures and open field crossing or rearing values.

### **3. Results**

To analyze the effect of caffeine and haloperidol on spontaneous locomotor activity, rats received i.p injections of these drugs 30 min before a 5 min open field behavioral session. Haloperidol (at 0.1 and 0.2 but not at 0.01 mg/Kg) significantly decreased the number of crossings and rearings during the open field session, but caffeine (1 and 3 mg/kg) have no effect on locomotion. Interestingly, when co-injected, caffeine (1 mg/kg) abolished the hypolocomotive action of haloperidol (0.2 mg/kg)

To study whether caffeine and haloperidol have any effect on anxiety levels at doses that do not affect locomotion, rats received i.p injections of these drugs 30 min before a 5 min plus maze session. Caffeine (1 mg/kg), but not haloperidol (0.01 mg/kg) increases the

number of entries and time spent into the open arms. When co-injected, haloperidol (0.01 mg/kg) blocked the anxiolytic effect of caffeine (1 mg/kg).

To evaluate the action of caffeine and haloperidol on memory expression, rats were trained in the water maze and inhibitory avoidance learning paradigms and evaluated for retention 24 h after training. When injected 30 min before inhibitory avoidance test session or a water maze probe test, haloperidol (0.01 mg/Kg) decreased both step-down latency and the percentage of time spent in the target quadrant, thus indicating that this drug blocks retrieval of inhibitory avoidance and water maze memory, respectively. By itself, caffeine had no effect at all on memory expression, but when co-injected with haloperidol, it completely reversed the amnesic effect that this compound had on inhibitory avoidance but not in water maze memory retrieval

#### **4. Discussion**

Here we present experimental evidence showing that caffeine is able to block the effect that haloperidol has on locomotion and inhibitory avoidance memory retrieval. We also showed that, at a low dose, caffeine is anxiolytic and that this effect can be blocked or reversed by haloperidol.

Previous studies have shown that adenosine  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors interact with dopamine  $D_1$  and  $D_2$  receptors, and that this interaction modulates locomotor activity (Ferré et al., 1997; Franco et al., 2000; Fuxe et al., 1998). The selective  $A_1$  receptor agonist  $N^6$ -cyclopentyladenosine (CPA) blocks the increase in motor activity elicited by  $D_1$ , but not  $D_2$  receptor agonist, while the selective  $A_{2A}$  receptor agonist CGS21680 prevented the increase in motor activity induced by  $D_2$ , but not  $D_1$  receptor agonists (Ferre et al., 1994a; Ferre et al., 1994b). Moreover, the  $A_{2A}$  antagonist KF17837 reverses the locomotor suppression and



tremulous jaw movements induced by systemic administration of haloperidol (Correa et al., 2004). Caffeine has well-documented effects on dopaminergic transmission and these actions are exerted mainly via adenosine A<sub>2A</sub> receptors. Moo-Puc and coworkers (2003) reported that caffeine and muscarinic antagonists act in synergy to inhibit haloperidol-induced catalepsy. In our study, we showed that caffeine reversed the decrease in locomotor activity induced by haloperidol. These results suggest that, at low doses, caffeine acting on adenosine A<sub>2A</sub> can reverse the decrease in dopamine transmission induced by haloperidol.

An increasing number of studies have pointed to a direct involvement of adenosine in anxiety (for review, see Millan, 2003). Mice lacking adenosine A<sub>1</sub> receptors display enhanced anxiety (Johansson et al., 2001; Gimerez-Llort et al., 2002; Lang et al., 2003). Although no consistent evidence for anxiolytic effects of adenosine A<sub>2A</sub> receptors stimulation has, to date, been obtained (Jain et al., 1995), some authors have demonstrated that adenosine A<sub>2A</sub> receptors can exert a facilitatory influence upon  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) release in the septum and in the hippocampus, actions which may be related to the observation that adenosine A<sub>2A</sub> receptor-knockout mice score higher than wild-type animals in anxiety tests (Ledent et al., 1997). Caffeine is considered an anxiogenic drug (Bhattacharya et al., 1997; Jones et al., 2002), however, in our study, caffeine presents an anxiolytic effect. This result is conflicting, but the doses used to establish the anxiogenic effect is higher (50- 100 mg/Kg) than the dose used in this work (1mg/Kg). In other study, caffeine did not demonstrate the classic anxiogenic effect in the elevated plus maze when administered at 12.5 mg/Kg (Yacoubi et al., 2000). Furthermore, the administration of high, but not low doses of caffeine, leads to an increase in measures of anxiety in humans (Greden, 1974). In fact, the anxiolytic effect of caffeine showed here may be via dopamine

D<sub>2</sub> receptors, since that the anxiolytic effect of caffeine was abolished when co-administered with haloperidol.

It has been shown that haloperidol induces deficit in spatial learning and memory (Ploeger et al., 1992; Skarsfeldt, 1996). Here haloperidol at dose of 0.01 mg/Kg impaired the retrieval of spatial memory in the Morris water maze and probably this effect was not due to an increase in locomotor activity, since that this dose was ineffective in alter the number of crossing in the open field. Furthermore, the amnesic effect of haloperidol was not reverted by the co-administration with caffeine, demonstrating that this effect was not related to adenosine receptors, at least in the dose of caffeine at 1 mg/Kg.

The inhibitory avoidance task is a hippocampal-dependent task and it is acquired in a single and brief training session. This task is ideal for investigating events associated with memory retrieval, without interference from previous expression of the learned behavior, which occurs in multi-trials task (Izquierdo and Medina, 1997). Here, we showed that haloperidol blocks inhibitory avoidance memory expression and that this effect was not related to any deficit in locomotor activity or to a modification in the animal's anxiety state. Importantly, we also found that the amnesic effect of haloperidol was reverted by caffeine co-administration. The mechanism through which caffeine blocks the amnesic effect of haloperidol can be only speculated. We demonstrated in previous study that specific adenosine receptors agonists, CPA and CGS21680, infused intra-posterior cingulate cortex were able to impaired memory retrieval to inhibitory avoidance task. Furthermore, in the same study, both A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors antagonists have no effect on retrieval (Pereira et al., *in press*). This means that the over stimulation and blockade of adenosine receptors, in a specific brain area, impaired and have no effect, respectively, in the IA memory retrieval. Here, similarly with the previous studies, but with other administration way, caffeine has no

effect on IA memory retrieval. It is known that blockade of D<sub>2</sub> receptors induces the concomitant up-regulation of A<sub>2A</sub>-mediated signaling (reviewed by Fredholm et al., 1999). Then, the amnesic effect of haloperidol could be via adenosine actions on A<sub>2A</sub> receptors, since that was previously demonstrated that stimulation of A<sub>2A</sub> receptor promotes amnesia and here, caffeine blockades the haloperidol-induced deficits.

Another possible explanation to caffeine action on haloperidol-amnesic effect is reinforced by the fact that functional effects of acute antipsychotic treatment require cAMP-induced PKA activation and phosphorylation of nuclear proteins (Turalba et al., 2004). Mice with a disruption in the gene of a regulatory subunit of PKA failed to demonstrate haloperidol-induced behavioral responses and activation of nigrostriatal neurons (Adams et al., 1997). Caffeine antagonizing the adenosine receptors, probably blockade the adenylyl cyclase/cAMP/PKA pathway, preventing the amnesic effect of haloperidol.

Altogether, these considerations have led to the hypothesis that an association between caffeine/haloperidol could be a new target in the study of alternatives treatments for schizophrenia, at least with respect to cognitive and locomotor deficits.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from FAPERGS, CNPq and PRONEX.

### **References**

- Adams, MR, Brandon, EP, Chartoff, EH, Idzerda, RL, Dorsa, DM, McKnight, GS. Loss of haloperidol induced gene expression and catalepsy in protein kinase A-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94: 12157-12161.

- Bevilaqua, LRM, Cammarota, M, Paratcha, G, de Stein, ML, Izquierdo, I, Medina, JH. Experience-dependent increase in cAMP-responsive element binding protein in synaptic and nonsynaptic mitochondria of the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 1999;11: 3753-3756.
- Bhattacharya, SK, Satyan, KS, Chakrabarti, A. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats, *J. Psychopharmacol.* 1997; 11: 219-224.
- Cammarota, M, Bevilaqua, LRM, Kerr, DS, Medina, JH, Izquierdo, I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *Journal of Neuroscience* 2003; 23: 737-741.
- Correa, M, Wisniecki, A, Betz, A, Dobson, DR, O'Neill, MF, O'Neill, MJ, Salamone, JD. The adenosine A<sub>2A</sub> antagonist KF17837 reverses the locomotor suppression and tremulous jaw movements induced by haloperidol in rats: possible relevance to parkinsonism. *Behavioural Brain Research* 2004; 148: 47-54.
- Dunwiddie, TV, Masino, SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Review Neuroscience* 2001; 24: 31-55.
- El Yacoubi, M, Ledent, C, Parmentier, M, Costentin, J, Vaugeois, J. The anxiogenic like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonists. *Psychopharmacology* 2000; 148: 153-163.
- Feoktistov, I, Baggioni, I. Adenosine A<sub>2B</sub> receptors. *Pharmacological Review* 1997; 49: 381-402.

- Ferre, S, von Euler, G, Johansson, B, Fredholm, BB, Fuxe, K. Stimulation of high-affinity adenosine A<sub>2</sub> receptors decreases the affinity of dopamine D<sub>2</sub> receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 7238-7241
- Ferre, S, O'Connor, WT, Snaprud, P, Ungerstedt, U, Fuxe, K. Antagonistic interaction between adenosine A<sub>2A</sub> receptors and dopamine D<sub>2</sub> receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience* 1994a; 63: 765-73.
- Ferre, S, Popoli, P, Gimenez-Llort, L, Finnman, UB, Martinez, E, Scotti de Carolis A, Fuxe, K. Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A<sub>1</sub> and dopamine D<sub>1</sub> receptors. *Neuroreport* 1994b; 6: 73-76.
- Ferre, S, Fredholm, BB, Morelli, M, Popoli, P, Fuxe, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1997; 20: 482-487.
- Finn, IB, Iuvone, PM, Holtzman, SG. Depletion of catecholamines in the brain of rats differentially affects stimulation of locomotor activity by caffeine, D-amphetamine, and methylphenidate. *Neuropharmacology* 1990; 29(7): 625-31.
- Fisone, G, Borghvist, A, Usiello, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Molecular Life Science* 2004; 61: 857-872.
- Florio, C, Rosati, AM, Traversa, U, Vertua, R. Inhibitory and excitatory effect of adenosine antagonists on spontaneous locomotor activity in mice. *Life Science* 1997; 60: 1477-1486.
- Franco, R, Ferré, S, Agnati, L, Torvinen, M, Ginés, S, Hillion, J, Casadó, V, Lledó, P, Zoli, M, Lluis, C, Fuxe, K. Evidence for adenosine / dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 2000; 23: 50-59.

- Fredholm, BB, Bättig, K, Holmén, J, Nehlig, A, Zvartau, E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews* 1999; 51: 83-133
- Fredholm, BB, Svenningsson, P. Adenosine-dopamine interactions: development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. *Neurology* 2003; 61(11 Suppl 6): S5-S9
- Friedman, JL, Harvey, PD, Kemether, E, Byne, W, Davis, KL. Cognitive and functional changes with aging in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1999; 47(7): 921-8
- Fuxe, K, Ferre, S, Zoli, M, Agnati, LF. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine  $A_{2A}$ /dopamine  $D_2$  and adenosine  $A_1$ /dopamine  $D_1$  receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev*. 1998; 26: 258-73.
- Gimenez-Llort, L, Fernandez-Teruel, A, Escorihuela, RM, Fredholm, BB, Tobena, A, Pekny, M. Mice lacking the adenosine  $A_1$  receptor are anxious and aggressive, but normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur. J. Neurosci*. 2002; 16: 547-550
- Greden, JF. Anxiety or caffeinism: a diagnostic dilemma. *Am J Psychiatry* 1974; 131: 1089-1092
- Hagger, C, Buckley, P, Kenny, JT, Friedman, L, Ubogy, D, Meltzer, HV. Improvement in cognitive functions and psychiatric symptoms in treatment-refractory schizophrenic patients receiving clozapine. *Biol Psychiatry* 1993; 34: 702-712
- Hughes, JR, McHugh, P, Holtzman, S. Caffeine and schizophrenia. *Psychiatr Serv*. 1998; 49: 1415-7.

- Izquierdo, I, Medina, JH. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory* 1997; 68: 285-316.
- Jacobson, KA. Adenosine A<sub>3</sub> receptors: novel ligands and paradoxical effects, *Trends Pharmacological Science* 1998; 19: 184-191.
- Jain, N, Kemp, N, Adeyemo, O, Buchanan, P, Stone, TW. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol* 1995; 116: 2127-2133
- Johansson, B, Halldner, L, Dunwiddie, TV, Masino, SA, Poelchen, W, Gimenez-Llort, L, Escorihuela, RM, Fernandez-Teruel, A, Wiesenfeld-Hallin, Z, Xu, Hardemark, A, Betsholtz, C, Herlenius, E, Fredholm, BB. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A<sub>1</sub> receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 9407-9412.
- Jones, N, Duxon, MS, King, SM. Ethnopharmacological analysis of the unstable elevated exposed plus maze, a novel model of extreme anxiety: predictive validity and sensitivity to anxiogenic agents, *Psychopharmacology* 2002; 161: 314-323
- Kenny, JT, Meltzer, HY. Attention and higher cortical functions in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1991; 3: 269-275.
- Lang, UE, Lang, F, Richter, K, Vallon, V, Lipp, HP, Schnermann, J, Wolfer, DP. Emotional instability but intact spatial cognition in adenosine receptor 1 knockout mice. *Behav. Brain Res*. 2003; 145: 179-188.
- Ledent, C, Vaugeois, JM, Schiffmann, SN, Pedrazzini, T, El Yacoubi, M, Vanderhaeghen, JJ, Costentin, J, Heath, JK, Vassart, G, Parmentier, M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *Nature* 1997; 388: 674-678.

- Malec, D. Haloperidol-induced catalepsy is influenced by adenosine receptor antagonists. *Pol. J. Pharmacol.* 1997; 49: 323-327.
- Millan, MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog. Neurobiol* 2003; 70: 83-244
- Moo-Puc, RE, Gongora-Alfaro, JL, Alvarez-Cervera, FJ, Pineda, JC, Arankowsky-Sandoval, G, Heredia-Lopez, F. Caffeine and muscarinic antagonists act in synergy to inhibit haloperidol-induced catalepsy. *Neuropharmacology.* 2003; 45: 493-503.
- Mukhopadhyay, S, Poddar, MK. Caffeine-induced locomotor activity: possible involvement of GABAergic-dopaminergic-adenosinergic interaction. *Neurochemical Res.* 1995; 20: 39-44.
- Nehlig, A, Daval, JL, Debry, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Review* 1992; 17: 139-170.
- Pellow, S, Chopin, P, File, SE, Briley, M. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1985; 14: 149-167.
- Pereira, GS, Rossato, JI, Sarkis, JF, Cammartota, M, Bonan, CD, Izquierdo, I. Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex impairs memory retrieval in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory* 2005, *in press*.
- Ploeger, GE, Spruijt, BM, Cools, AR. Effects of haloperidol on the acquisition of a spatial learning task. *Physiol Behav.* 1992; 52: 979-83.
- Ribeiro, JA, Sebastião, AM, de Mendonça, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology* 2003; 68: 377-392



Sharma, T. Cognitive effects of conventional and atypical antipsychotics in schizophrenia.

Br J Psychiatry 1999; 38: 44-51

Skarsfeldt, T. Differential effect of antipsychotics on place navigation of rats in the Morris

water maze. A comparative study between novel and reference antipsychotics,

Psychopharmacology 1996; 124: 126-133~

Tsai, ST. Adenosine  $A_{2A}$  receptor/dopamine D2 receptor hetero-oligomerization: a

hypothesis that may explain behavioral sensitization to psychostimulants and

schizophrenia. Med Hypotheses 2005; 64(1): 197-200.

Turalba, AV, Leite-Morris, KA, Kaplan, GB. Antipsychotics regulate cyclic AMP-

dependent protein kinase and phosphorylated cyclic AMP response element-binding

protein in striatal and cortical brain regions in mice. Neurosci Lett. 2003; 357: 53-57.

## Legends

Figure 1: The animals were injected intraperitoneally with vehicle (4% DMSO), caffeine (1 and 3 mg/Kg), haloperidol (0.01, 0.1 and 0.2 mg/Kg) or caffeine (1mg/Kg) plus haloperidol (0.2mg/Kg) thirty minutes before the exposure to an open field during 5-min. Data were expressed in mean  $\pm$  SEM, N = 8-10 per group. \*indicate statistical difference from vehicle group. ( $P < 0.05$ ) # indicates statistical difference from group that received haloperidol at 0.2 mg/Kg ( $P < 0.001$ ).

Figure 2: The animals were injected intraperitoneally with vehicle (4% DMSO), caffeine (1 mg/Kg), haloperidol (0.01 mg/Kg) or caffeine (1mg/Kg) plus haloperidol (0.01mg/Kg) thirty minutes before the exposure to an elevated plus maze during 5-min. Data were expressed in mean  $\pm$  SEM, N = 8-10 per group. \*indicate statistical difference from vehicle group ( $P < 0.05$ ).

Figure 3: Medians (interquatile range) of retention scores of training (white bars) and test (gray bars) sessions in groups intraperitoneally inject with vehicle (4% DMSO), caffeine (1 mg/Kg), haloperidol (0.01 mg/Kg) or caffeine (1mg/Kg) plus haloperidol (0.01mg/Kg) thirty minutes before test session in inhibitory avoidance task. N = 10-15 per group \*indicate statistical difference from vehicle group ( $P < 0.001$ ). # indicates statistical difference from group that received haloperidol at 0.01 mg/Kg ( $P < 0.01$ ).

Figure 4: All animals learning at the end of five days of training in Morris water maze (A). Effect of the administration of vehicle (4% DMSO), caffeine (1 mg/Kg), haloperidol (0.01

mg/Kg) or caffeine (1mg/Kg) plus haloperidol (0.01mg/Kg) thirty minutes before test session on the retrieval of the Morris water maze task (B). The results are reported as mean  $\pm$  SEM latency, N = 8-10 per group. \*indicate statistical difference from vehicle group ( $P < 0.05$ ). # indicates statistical difference from group that received caffeine at 1 mg/Kg ( $P < 0.05$ ).

Figure 1

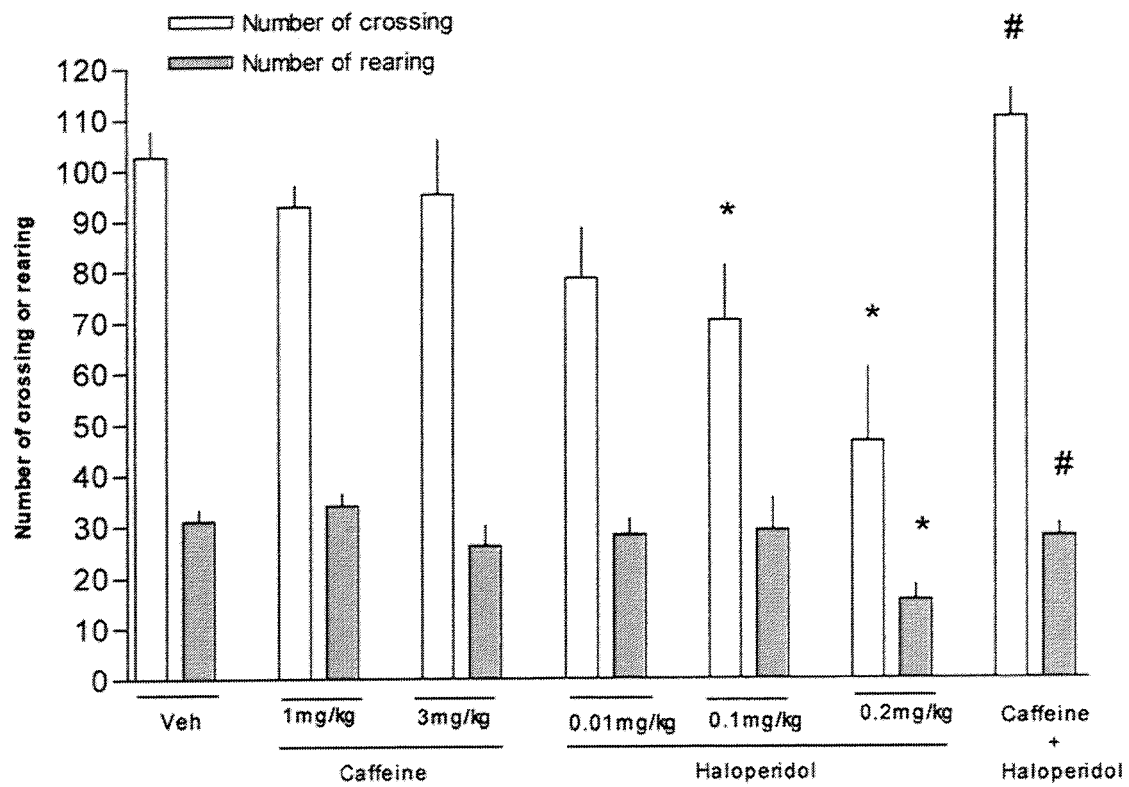


Figure 2 A

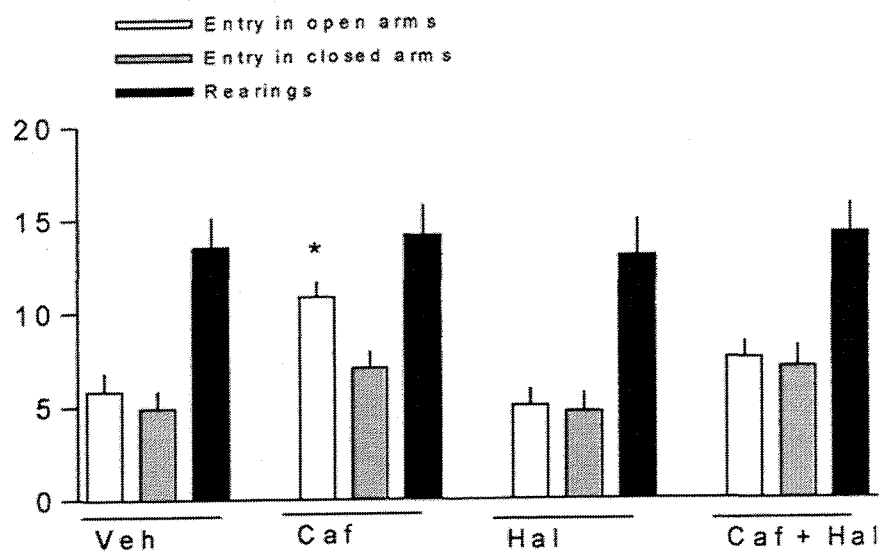


Figure 2B

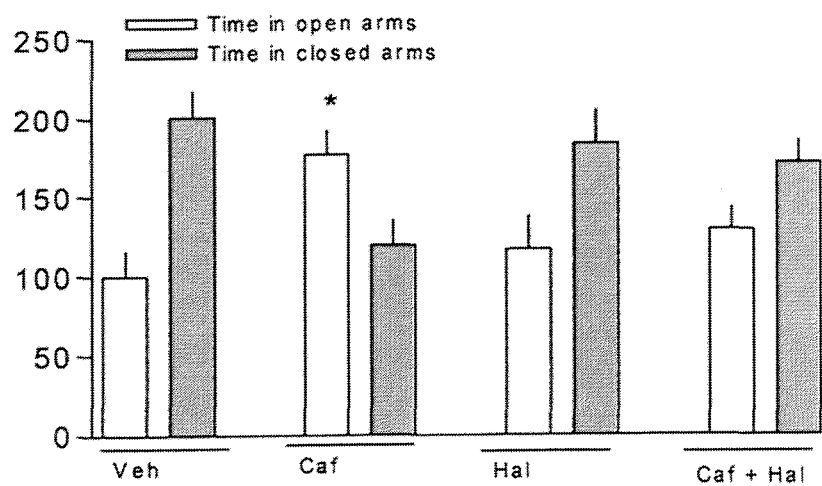


Figure 3

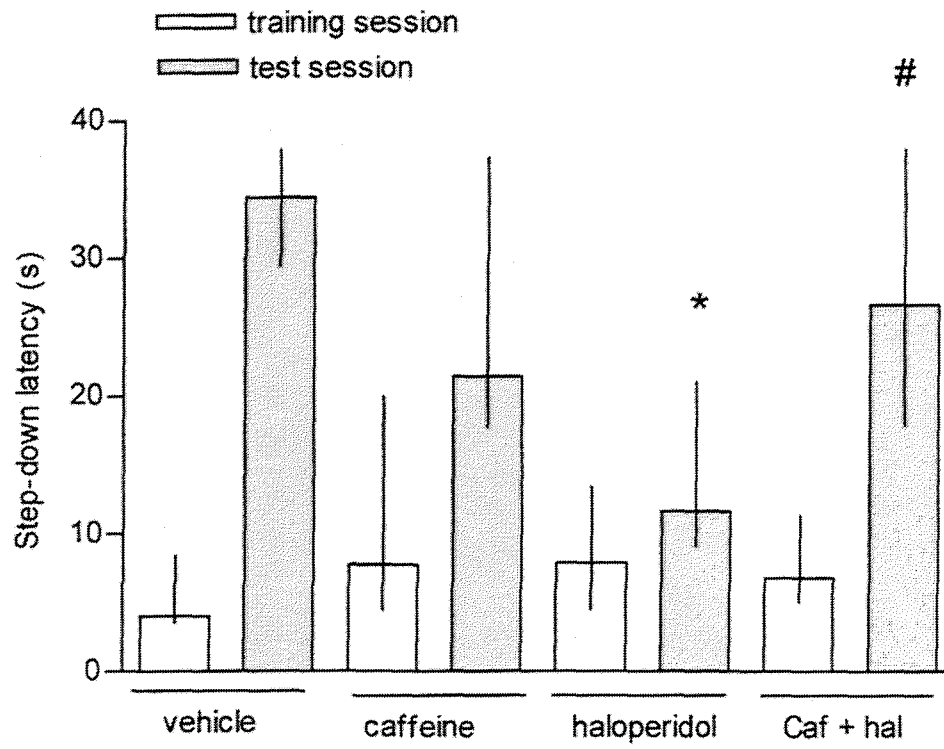


Figure 4 A

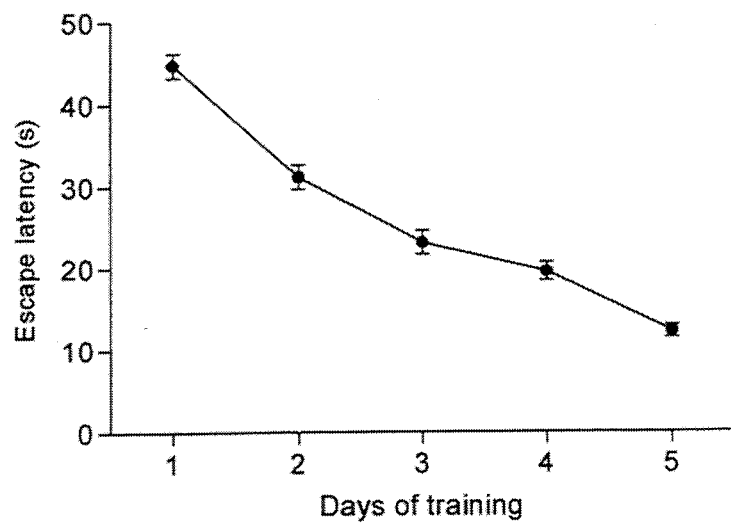
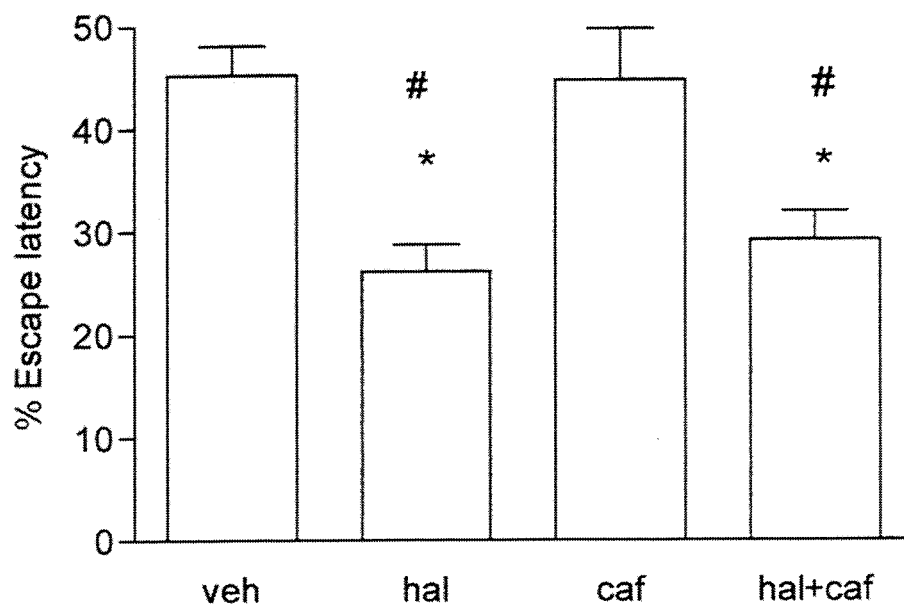


Figure 4 B



### 3. DISCUSSÃO

---

Os resultados apresentados nesta tese demonstram que o sistema adenosinérgico do córtex cingulado posterior modula a consolidação da memória para a tarefa não-associativa de habituação, bem como a evocação da memória para a tarefa associativa, esquiva inibitória.

Quando administrada intraperitonealmente, a cafeína, agindo nos receptores de adenosina, foi capaz de reverter o efeito amnésico induzido pelo antagonista de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, haloperidol, na evocação da memória para a tarefa de esquiva inibitória. Quanto à atividade locomotora, medida no campo aberto, a cafeína reverteu o efeito sedativo do haloperidol, sendo que esta reversão não ocorreu quando a tarefa utilizada foi o labirinto aquático de Morris que mede memória espacial. Além disso, a cafeína, na dose de 1 mg/Kg, interferiu nos níveis de ansiedade medida no labirinto em cruz elevado, sendo que este efeito ansiolítico foi revertido pela co-administração do haloperidol.

Em estudos prévios, ao administrarmos o antagonista de receptores de adenosina A<sub>1</sub>, DPCPX, no córtex cingulado posterior (CCP) de ratos, imediatamente após a sessão de treino na esquiva inibitória, o tempo de latência dos animais aumentou, demonstrando assim um efeito pró-mnésico deste antagonista. Já quando administramos o agonista de receptores A<sub>1</sub>, nas mesmas condições anteriores, não houve alteração na consolidação da memória (Pereira et al., 2002). Esta foi a primeira evidência que nos levou a acreditar que o sistema adenosinérgico interfere na funcionalidade do CCP, mais especificamente modulando a consolidação da memória para a tarefa de esquiva inibitória.

Postula-se que a evocação da memória pode ser em parte similar aos processos de aquisição e consolidação. No entanto, não existem estudos que demonstrem a participação do sistema adenosinérgico do



CCP na evocação da memória. Já que a consolidação da memória em CCP mostrou-se sensível a intervenções farmacológicas no sistema adenosinérgico, no artigo 1 desta tese estudamos o efeito de agonistas e antagonistas de ambos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , infundidos no CCP, na evocação da memória de longa duração na tarefa de esquiva inibitória. Nossos resultados demonstraram que a ativação dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , antes da evocação, tem efeito amnésico.

A evocação tem sido considerada, tradicionalmente, dependente do hipocampo (Eldridge et al., 2000; Corcoran & Maren, 2001, Anderson et al., 2004). No entanto, recentemente foi demonstrado que para a evocação de uma tarefa simples, como a tarefa de esquiva inibitória, é necessário a intervenção simultânea do hipocampo, dos córtices entorrinal, parietal, cingulado anterior e posterior, além da amígdala basolateral (van Hoesen, 1985; Hyman et al., 1990; Barros et al., 2003). No hipocampo e em todas as áreas neocorticais examinadas, o funcionamento normal dos sistemas de sinalização da PKA e da ERK, além da ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos são necessários para a evocação (Barros et al., 2000, 2003). Os receptores metabotrópicos são necessários juntamente com os receptores AMPA, no hipocampo e córtex entorrinal, sendo que nos córtices parietal e cingulado anterior são necessários os receptores NMDA (Barros et al., 2000).

Existem vários estudos demonstrando o papel dos receptores  $A_1$  em processos cognitivos. A administração sistêmica do agonista seletivo de  $A_1$ , CPA, prejudica a aquisição do condicionamento ao medo contextual (Corodimas & Tomita, 2001) e esquiva passiva (Normile & Barraco, 1991). Corroborando com estes resultados, outro agonista seletivo de receptores  $A_1$ , CHA, aumentou o número de erros em tarefa de memória de trabalho (Ohno & Watanabe, 1996) e mostrou efeitos

aditivos em restaurar amnésia induzida por morfina na tarefa de esquiva passiva (Khavandgar et al., 2001).

Se a ativação dos receptores  $A_1$  no CCP não interferiu na consolidação da memória, por que esta ativação prejudicou a evocação da memória? Estudos provenientes do nosso laboratório demonstraram que AP5, um antagonista de receptores NMDA, infundido nos córtices parietal e cíngulo anterior prejudicam a evocação da memória (Barros et al., 2000). Então, é razoável sugerir que a integridade dos receptores NMDA é necessária na evocação. A ativação de receptores  $A_1$  promove diminuição na liberação de glutamato (Dunwiddie & Haas, 1985), reduzindo a ativação dos receptores NMDA (de Mendonça et al., 1995) e conseqüentemente prejudicando a evocação da memória. Logo, a possível interferência que a ativação dos receptores  $A_1$  de adenosina exerceria sobre os receptores NMDA, poderia explicar, pelo menos em parte, o efeito amnésico do CPA.

Ainda no artigo 1, demonstramos que a ativação dos receptores  $A_{2A}$  no CCP também prejudicou a evocação da memória. Os receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  estão acoplados a proteínas  $G_i/G_o$  e  $G_s$ , respectivamente, cujos efeitos sobre a via de sinalização da PKA são opostos (revisado por Ribeiro et al., 2003). Logo, a ativação destes dois receptores, teoricamente não poderia apresentar o mesmo efeito amnésico. Halldner e colaboradores (2004) mostraram evidências de que CGS 21680, agonista de receptores  $A_{2A}$ , liga em receptores  $A_1$  no hipocampo de camundongos nocautes para receptores  $A_{2A}$ . Além disso, não houve alterações adaptativas na expressão dos receptores  $A_{2A}$  nos camundongos nocautes para receptores  $A_1$ , indicando assim um novo local de ligação no hipocampo para o CGS 21680 diferente dos receptores  $A_{2A}$ .

Os resultados mostrados no artigo 1 excluem que o efeito amnésico do CGS 21680 seja devido sua ligação nos receptores  $A_1$ .

Além disso, confirmamos que o efeito amnésico de ambos agonistas, CGS 21680 e CPA, deve-se a ligação nos seus respectivos receptores  $A_{2A}$  e  $A_1$ , já que os antagonistas destes receptores bloquearam o efeito amnésico.

Ainda de acordo com Halldner e colaboradores (2004), a expressão de receptores  $A_{2A}$  não é dependente da presença ou ausência de receptores  $A_1$ . A função dos receptores  $A_{2A}$  não parece ser marcadamente afetada por alterações nos receptores  $A_1$ , desde que as ações comportamentais da cafeína, no estriado, que são inteiramente dependentes do bloqueio dos receptores  $A_{2A}$  (Ledent et al., 1997; El Yacoubi et al., 2000) são levemente afetados em animais que perderam os receptores  $A_1$  (Halldner et al., 2004b). Por outro lado, as ações mediadas pelos receptores  $A_{2A}$  em áreas com baixa expressão destes receptores, como é o caso do córtex cingulado posterior, parecem ser dependentes dos receptores  $A_1$  (O' Kane & Stone, 1998; Lopes et al., 1999; Cunha & Ribeiro, 2000). Além disso, a ativação dos receptores  $A_{2A}$ , pelo CGS 21680, em terminais nervosos hipocámpais e corticais diminuiu a afinidade do CPA pelos receptores  $A_1$ . Esta dessensibilização dos receptores  $A_1$  induzida pela ativação de receptores  $A_{2A}$  foi mediada pela PKC, mas não pela PKA (Lopes et al. 1999). Logo, é possível que o efeito amnésico induzido pelo CGS 21680 envolva a via de sinalização da PKC, mais que a via da PKA. Logo, o efeito amnésico dos dois agonistas adenosinérgicos poderiam estar recrutando vias de sinalização diferentes.

Cabe salientar que os efeitos das drogas utilizadas nos experimentos do artigo 1, sobre a evocação da memória não são devidos a alterações na atividade locomotora e níveis de ansiedade, já que foram realizados testes no campo aberto e labirinto em cruz elevado que descartam esta possibilidade.

Já que o sistema adenosinérgico do CCP participa da consolidação e da evocação da memória para a tarefa de esquivas inibitória, haveria algum tipo de intervenção desse sistema em outra tarefa de aprendizado? De fato, tem sido demonstrado que o sistema adenosinérgico participa da formação da memória em diferentes tarefas comportamentais, como esquivas inibitórias (Kopf et al., 1999; Pereira et al., 2002), comportamento investigatório (Meyer and Caston, 2004) e labirinto aquático de Morris (Angelucci et al., 2002). No entanto, não há nenhum estudo com respeito às funções do sistema adenosinérgico na habituação a um novo ambiente, apesar da adenosina desempenhar um importante papel na neuromodulação da transmissão sináptica (para revisão, Dunwiddie & Masino, 2001). Além disso, não há estudos mostrando a participação do CCP na habituação a um novo ambiente, apesar de ter sido demonstrado o importante papel do CCP na análise da significância de objetos e na passagem desta representação para o hipocampo formar memórias referentes a esses novos objetos (Pandya and Yeterian, 1984).

Assim, os resultados do artigo 2 mostraram que o antagonista de receptores  $A_1$ , DPCPX, prejudicou a habituação ao novo ambiente, sendo este efeito oposto ao encontrado na esquivas inibitórias, onde o DPCPX melhorou a consolidação da memória.

De fato, vários estudos mostram que a formação da memória para habituação difere não somente da esquivas inibitórias, mas também de tarefas de medo contextual, aprendizagem espacial e outras tarefas associativas em diferentes espécies (Carew, 1996; Kopf & Baratti, 1996; Bourtchouladze et al. 1994; Schafe et al., 1999; Viana et al., 2000). Isto sugere que memórias associativas e não-associativas recrutam mecanismos diferentes para sua formação. Viana et al. (2001) demonstraram que receptores glutamatérgico do tipo NMDA e proteína quinase A apresentam efeitos opostos em tarefas de aprendizado

associativo e não-associativo, quando a estrutura alvo de intervenções farmacológicas foi o hipocampo.

Além de diferenças quanto à participação de sistemas bioquímicos hipocampais em tarefas associativas e não-associativas, as vias bioquímicas corticais envolvidas na evocação da memória não são idênticas às envolvidas na consolidação da memória (Barros et al., 2000; Barros et al., 2001).

Uma vez que demonstramos os efeitos dos receptores de adenosina na evocação da tarefa de esquivas inibitória, através de agonistas e antagonistas específicos, administrados intra-CCP, o próximo passo foi investigar de que forma a cafeína, antagonista adenosinérgico inespecífico, agiria na evocação da mesma tarefa e da tarefa do labirinto aquático de Morris, agora em nível sistêmico.

Vários motivos nos incentivaram a optar pela cafeína. O consumo de cafeína ocupa importante lugar na cultura da maioria das nações mundiais, estando presente na dieta sob diferentes formas (Barone & Roberts, 1996). A atuação da cafeína nos receptores  $A_{2A}$  tem emergido como alvo potencial para o desenvolvimento de novos antiparkinsonianos (Richardson et al., 1997; Correa et al., 2004) além de exercer efeitos sobre alguns dos sintomas da esquizofrenia em modelos animais (Dall'Igna et al., 2003). Estes efeitos devem-se principalmente ao fato da cafeína, ao agir nos receptores  $A_{2A}$ , modular a função motora do sistema dopaminérgico (Richardson et al., 1997). De fato, estudos bioquímicos e comportamentais têm demonstrado que os receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  interagem com os receptores dopaminérgicos  $D_1$  e  $D_2$ , respectivamente (Ferre et al., 1997; Franco et al., 2000; Fuxe et al., 1998). Escolhemos o haloperidol, antipsicótico típico que age como antagonista dos receptores  $D_2$ , para estudar os efeitos da interação entre receptores adenosinérgicos e dopaminérgicos devido aos efeitos sedativos e prejuízos cognitivos causados por este neuroléptico (Ploeger

et al., 1992; Nowakowska et al., 1999; Rosengarten et al., 2002; Gemperle et al., 2003).

Primeiramente, avaliamos os efeitos de diferentes doses de cafeína e haloperidol sobre a locomoção. As duas doses de cafeína utilizadas (1 e 3 mg/Kg) não afetaram a locomoção. Já das três doses testadas de haloperidol (0.01; 0.1 e 0.2 mg/Kg), somente a mais alta foi efetivamente sedativa. A co-administração de cafeína reverteu o efeito sedativo do haloperidol, demonstrando que a o antagonismo de receptores adenosinérgicos, possivelmente dos receptores  $A_{2A}$ , impede que um dos efeitos colaterais do haloperidol se expresse.

Utilizamos, primeiramente, a tarefa de esquiva inibitória para avaliar o efeito do haloperidol, numa dose inefetiva na atividade locomotora e exploratória, sobre a evocação da memória. Demonstramos que o haloperidol na dose de 0.01 mg/Kg foi amnésico, sendo este efeito revertido pela cafeína. No capítulo 2, mostramos que agonistas adenosinérgicos, CPA e CGS 21680, quando administrados intra-CCP, prejudicam a evocação da memória. A cafeína, assim como os antagonistas específicos DPCPX e ZM 21680, não teve efeito *per se*. Logo, o efeito amnésico do haloperidol poderia estar ocorrendo via receptores  $A_{2A}$ . Outra possível explicação baseia-se no fato dos efeitos agudos do haloperidol serem dependentes de ativação da PKA (Adams et al., 1997; Turalba et al., 2004). Assim, a cafeína estaria bloqueando a ativação desta via de sinalização, impedindo os efeitos amnésicos do haloperidol.

Ainda testamos a interação entre cafeína e haloperidol no labirinto aquático de Morris. A cafeína na dose utilizada (1 mg/Kg) não teve efeito além de bloquear o prejuízo na memória espacial induzida pelo haloperidol. Este efeito amnésico não foi devido a diminuição na locomoção dos animais, já que a dose utilizada não afetou a locomoção no campo aberto. Ploeger e colaboradores (1992) mostraram que o

haloperidol prejudicou a aquisição da memória espacial. Já os efeitos da cafeína sobre a memória espacial variam de acordo com as doses utilizadas e os protocolos utilizados, sendo que doses baixas como as utilizadas aqui costumam não afetar a evocação da memória espacial (Angelucci et al., 2002). No entanto, diferentemente do encontrado na tarefa de esQUIVA inibitória, a cafeína não foi capaz de reverter o prejuízo na memória espacial causado pelo haloperidol.

Outro resultado bastante interessante apresentado no artigo 3, foi quanto ao efeito ansiolítico da cafeína na dose de 1 mg/Kg. A cafeína é tradicionalmente reconhecida como uma droga ansiogênica (Bhattacharya et al., 1997; Yacoubi et al., 2000; Jones et al., 2002). Mas, as doses que apresentam o efeito ansiogênico são no mínimo vinte vezes superiores à utilizada no capítulo 3. Yacoubi e colaboradores (2000) ao testarem o efeito da cafeína, 12.5 mg/Kg, no labirinto em cruz elevado, não encontraram o efeito ansiogênico clássico. Além disso, a administração de altas, mas não de baixas doses de cafeína levou a um aumento da ansiedade em humanos (Greden 1974). Já que este efeito ansiolítico foi revertido pela co-administração de haloperidol, é possível que o efeito ansiolítico da cafeína seja via receptores D<sub>2</sub>.

#### 4- CONCLUSÕES GERAIS

---

Os resultados apresentados nesta tese nos permitem sugerir que a funcionalidade do sistema adenosinérgico é necessária para que os processos de consolidação e evocação da memória sejam realizados em diferentes paradigmas comportamentais.

Esta conclusão fica evidenciada nos resultados obtidos neste trabalho. No artigo 1, demonstramos que a ativação de receptores adenosinérgicos,  $A_1$  e  $A_{2A}$ , no CCP, prejudica a evocação da memória na tarefa de esquiva inibitória. Este efeito foi diferente do encontrado na consolidação da memória para a mesma tarefa, demonstrando assim, que pelo menos os receptores  $A_1$ , agem de forma diferenciada na consolidação e evocação da memória associativa, medida na tarefa de esquiva inibitória.

No artigo 2, constatamos que o DPCPX, um antagonista dos receptores  $A_1$ , intra-CCP, impede que ocorra habituação a um novo ambiente. Assim, é possível sugerir que o sistema adenosinérgico participa da consolidação de uma memória não-associativa, como a habituação ao campo aberto.

No artigo 3, investigamos o efeito da cafeína e/ou do haloperidol em diferentes paradigmas comportamentais. Neste trabalho, a cafeína foi capaz de (1) normalizar a locomoção de ratos que receberam haloperidol, (2) bloquear o prejuízo na evocação da memória induzido pelo haloperidol, quando a tarefa utilizada foi a esquiva inibitória e não o labirinto aquático de Morris. Além disso, demonstramos que doses baixas de cafeína, como 1mg/Kg, possuem efeitos ansiolíticos, sendo que estes podem ser diminuídos pela co-administração com haloperidol. Estes resultados demonstram que os sistemas adenosinérgico e dopaminérgico interagem em diferentes paradigmas comportamentais.



---

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abbracchio MP, Brambilla R, Ceruti S, Kim HO, von Lubitz DK, Jacobson KA & Cattabeni F (1995a) G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A<sub>3</sub> receptors in rat brain. *Molec. Pharmacol.* 48: 1038-1045.
- Abbracchio MP, Ceruti S, Burnstock G & Cattabeni F (1995b) Purinoreceptors on glial cells of the central nervous system: Functional and pathological implications. In: *Adenosine and Adenine Nucleotides: From Molecular Biology to Integrative Physiology*, Belardinelli L & Pelleg A (Eds.). Kluwer Academic Press, Norwell, pp. 271-280.
- Adams MR, Brandon EP, Chartoff EH, Idzerda RL, Dorsa DM & McKnight GS (1997) Loss of haloperidol induced gene expression and catalepsy in protein kinase A-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12157-12161.
- Akbar M, Okajima F, Tomura H, Shimegi S & Kondo Y (1994) A single species of A<sub>1</sub> receptor expressed in chinese hamster ovary cells not only inhibits cAMP accumulation but also stimulates phospholipase C and arachidonate release. *Mol. Pharmacol.* 45: 1036-1042.
- Akhondzadeh S, Shasavand E, Jamilian H, Shabestari O & Kamalipour A (2000) Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosin-dopamine receptor interactions. *J. Clin. Phar. Ther.* 25: 131-137.
- Ambrósio AF, Malva JO, Carvalho AP & Carvalho AM (1997) Inhibition of N-, P/Q- and other types of Ca<sup>2+</sup> channels in rat hippocampal nerve terminals by adenosine A<sub>1</sub> receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 340: 301-310.
- Anderson MC, Ochsner KN, Cooper J, Robertson E, Gabrieli SW, Clover GH & Gabrieli JDE (2004) Neural systems underlying the suppression of unwanted memories. *Science* 303: 232-235.
- Angelucci MEM, Cesário C, Hiroi RH, Rosalen PL & da Cunha, C (2002) Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 35: 1201-1208.
- Arai A, Kessler M & Lynch G (1990) The effects of adenosine on the development of long-term potentiation. *Neurosci. Lett.* 119(1): 41-44.
- Asano T, Shinohara H, Morishita R, Norota I, Kato K & Endoh M (1995). The G-protein G<sub>0</sub> in mammalian cardiac muscle: localization and coupling to A<sub>1</sub> adenosine receptors. *J. Biochem. (Tokyo)* 117: 183-189.

- Au Lois NC, Niquet J, Ben-Ari Y & Represa A (1997) Cellular plasticity. In: *Epilepsy: a comprehensive textbook*, Jr. Engel J, Pedley TA (Eds.). Lippincott-Raven Publishers, pp. 387-396.
- Barone J & Roberts HR (1996) Caffeine consumption. *Food Chem. Toxicol.* 34: 119-129.
- Barros DM, Izquierdo LA, Mello e Souza T, Ardenghi PG, Pereira P, Medina JH & Izquierdo I (2000) Molecular signaling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behavior Brain Research*, 114, 183-192.
- Barros DM, Izquierdo, LA, Medina JH & Izquierdo I (2003) Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of memory retrieval. *Current Drug Targets* 2, 81-94.
- Battacharya SK, Satyan KS, Chakrabarti A (1997) Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *J. Psychopharmacol.* 11: 219-224.
- Bear MF, Connors BW & Paradiso, MA (1995). *Neuroscience: Exploring the Brain*. Baltimore: Willians & Wilkins, pp. 386-390.
- Bear FB, Connors BW, Paradiso MA (2002). *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. Ed. Artmed, São Paulo.
- Bernabeu R, Izquierdo I, Cammarota M, Jerusalinky D & Medina JH (1995) Learning-specific, time-dependent increase in <sup>3</sup>H-phorbol dibutyrate binding to protein kinase C in selected regions of rat brain. *Brain Res.* 685: 163-168.
- Bernabeu R, Schmitz P, Faillace MP, Izquierdo I & Medina JH (1996) Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of an inhibitory avoidance learning. *Neuroreport* 7: 585-588.
- Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schimitz P, Bianchin M, Izquierdo I & Medina JH (1997) Involvement of hippocampal D1/D5 receptor-cAMP signalling pathways in a late memory consolidation phase of an aversively-motivated task in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7041-7046.
- Bliss TVP & Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of anesthetized rabbit following stimulation of perforant path. *Journal of Physiology (London)* 232: 331-356.
- Bliss TPV & Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term-potentiation in the hippocampus. *Nature (London)* 361: 31-39.
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER (1998) Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory

- consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learning and Memory* 5: 365-374.
- Braunewell KH & Manahan-Vaughans (2001) Long-term depression: a cellular basis for learning? *Rev. Neurosci.* 12: 121-140.
- Bridges AJ, Moos WH, Szotek DL, Trivedi BK, Bristol JA, Heffner TG, Bruns RF, Downs DA (1987) N6- (2,2-diphenylethyl) adenosine, a novel adenosine receptor agonist with antipsychotic-like activity. *J. Med. Chem.* 30: 1709-1711.
- Brodmann K (1909) Vergleichende lokalisationslehre der grosshirnrinde in ihren prinzipien dargestellt auf grund des zellenbaues. Leipzig: Barth.
- Cammarota M, Bernabeu R, Izquierdo I & Medina JH (1996) Reversible changes in hippocampal [<sup>3</sup>H]AMPA binding following inhibitory avoidance training in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 66: 85-88.
- Cammarota M, Paratcha G, Levi de Stein M, Bernabeu R, Izquierdo I & Medina JH (1997). B50/GAP43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance learning. *Neurochem. Res.*, 22: 499-505.
- Carew TJ (1996) Molecular enhancement of memory formation. *Neuron* 16: 5-8.
- Cascalheira JF & Sebastião AM (1998) Adenosine A<sub>1</sub> receptor activation inhibits basal accumulation of inositol phosphates in rat hippocampus. *Pharmacol. Toxicol.* 82: 189-192.
- Corcoran KA & Maren S (2001) Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *J. Neurosci.* 21: 1720-1726.
- Corodimas KP & Tomita H (2001) Adenosine A<sub>1</sub> receptor activation selectively impairs the acquisition of contextual fear conditioning in rats. *Behavior Neuroscience* 115: 1283-1290.
- Correa M, Wisniecki A, Betz A, Dobson DR, O'Neill MF, O'Neill MJ & Salamone JD (2004) The adenosine A<sub>2A</sub> antagonist KF17837 reverses the locomotor suppression and tremulous jaw movements induced by haloperidol in rats: possible relevance to parkinsonism. *Behavioural Brain Research* 148: 47-54.
- Cotman CW (1998) Axonal sprouting. In: *Basic neurochemistry: Molecular cellular and medical aspects*, 6<sup>th</sup> Ed.. Siegel, GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fischer SK, Uhler MD (Eds.). Lippincott-Raven Publishers, pp 589-612.
- Cunha RA, Johansson B, van der Ploeg I, Sebastião AM, Ribeiro JA & Fredholm BB (1994) Evidence for functionally important adenosine A<sub>2A</sub> receptors in rat hippocampus. *Brain Res.* 649: 208-216.

- Cunha RA & Ribeiro JA (2000) Purinergic modulation of [<sup>3</sup>H] GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology* 39: 1156-1167.
- Cunha RA & Ribeiro JA (2000) ATP as a presynaptic modulator. *Life Sciences* 68: 119-137.
- Cunha RA (2001) Adenosine as a modulator and as homeostatic regulator in the nervous system: distinct roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38: 107-125.
- Daisley JN & Rose SPR (1999) Adenosine-amino acid interactions in the chick brain: a role in passive avoidance learning. *Brain Res.* 847: 149-156.
- Dall'Igna OP, da Silva AL, Dietrich MO, Hoffmann A, Oliveira RV, Souza DO & Lara DR (2003) Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice. *Psychopharmacology* 166: 258-263.
- Dash PK, Hebert AE & Runyan JD (2004) A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 45: 30-37.
- de Mendonça A & Ribeiro JA (1990) 2-Chloroadenosine decreases long-term potentiation in the hippocampal CA1 area of the rat. *Neurosci. Lett.* 118: 107-111.
- de Mendonça A & Ribeiro JA (1997) Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci.* 60: 241-245.
- de Mendonça JA, Sebastião AM & Ribeiro JA (1995) Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampus neurones by adenosine A<sub>1</sub> receptor activation. *Neuroreport* 6: 1097-1100.
- de Mendonça A & Ribeiro JA (2000) Long-term potentiation observed upon blockade adenosine A<sub>1</sub> receptors in rat hippocampus in N-methyl-D-aspartate receptor-dependent. *Neurosci. Lett.* 291: 81-84.
- de Mendonça A & Ribeiro JA (2001) Adenosine and synaptic plasticity. *Drug Develop. Res.* 52: 283-290.
- Deese J & Hulse SH (1975) *A Psicologia da Aprendizagem*. Livraria Pioneira Editora, São Paulo. 502p.
- Deportere R, Boulay D, Perrault G, Decobert M, Franron D, Jung M, Simiand J, Soubrie P & Scatton B (2003) SSR 181507, a dopamine D2 receptor antagonist and 5-HT1A receptor agonist. II: Behavioral profile predictive of an atypical antipsychotic activity. *Neuropsychopharmacol.* 28: 1889-1902.
- Dixon DA, Fenix LA, Kim DM & Raffa RB (1999) Indirect modulations of dopamine D2 receptors as potential pharmacotherapy for schizophrenia. I Adenosine agonists. *Ann. Pharmacother* 33: 480-488.

- Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55: 51-86.
- Dunwiddie TV & Fredholm BB (1989) Adenosine A<sub>1</sub> receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249: 31-37.
- Dunwiddie TV & Haas HL (1985) Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J. Physiol.* 369: 365-77.
- Dunwiddie TV (1995) The physiological role of adenosine in the central nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* 27: 63-139.
- Dunwiddie TV & Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 24: 31-55.
- El Yacoubi M, Ledent C, Menard JF, Parmentier M, Costentin J & Vaugeois JM (2000) The stimulant effects of caffeine in locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A<sub>2A</sub> receptors. *Br. J Pharmacol* 129: 1465-1473.
- Eldridge LL, Knowlton BJ, Furmanski CS, Bookheimer SY, Engel SA (2000) Remembering episodes: a selective role for the hippocampus during retrieval. *Nat. Neurosci.* 3: 1149-1152.
- Ferré S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB & Fuxe K (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A<sub>2</sub> receptors decreases the affinity of dopamine D<sub>2</sub> receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7238-7241.
- Ferré F, 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: 482-7.
- File SE. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott JM, Heal DJ, Marsden CA, editors. *Experimental approaches to anxiety and depression*. New York: Wiley, 1992: 25-44.
- Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, Peterfreund RA, Pollack AE, Adler EM & Reppert SM (1992) Molecular cloning of the rat A<sub>2A</sub> adenosine receptor: selective co-expression with D<sub>2</sub> dopamine receptors in rat striatum. *Mol. Brain Res.* 14: 186-190.
- Franco R, Ferré S, Agnati R, Torvinen M, Ginés S, Hillion J, Casadó V, Lledó P, Zoli M, Lluís C & Fuxe K (2000) Evidence for adenosine / dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 23: 50-59.
- Frussa-Filho R, Otoboni JR, Gianotti AD, Amaral ACS & Conceição IM (1992) Effects of age on antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure. *Brazilian J Med. Biol Res* 25: 827-829.

- Fuster J (1998) Distributed memory for both short and long-term-memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 70: 268-274.
- Fuxe K, Ferre S, Zoli M & Agnati LF (1998) Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26: 258-73.
- Fuxe K, Strombeg I, Popoli P, Rimondini-Giorgini R, Torvinen M, Ogren SO, Franco R, Agnati LF & Ferré S (2001) Adenosine receptors and Parkinson's disease. Relevance of antagonists adenosine and dopamine receptor interactions in the striatum. *Adv. Neurol.* 86: 345-353.
- Ploeger GE, Spruijt BM, Cools AR (1992) Effects of haloperidol on the acquisition of a spatial learning task. *Physiol. Behav.* 52: 979-83.
- Gallagher M, Burwell R & Burchinal M (1993) Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav. Neurosci.* 107: 618-626.
- Gemperle AY, McAllister KH & Olpe HR (2003) Differential effects of iloperidone, clozapine and haloperidol on working memory of rats in the delayed non-matching-to-position paradigm. *Psychopharmacology* 169: 354-364.
- Goff DC & Coyle JT (2001) The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 158: 1367-1377.
- Gold PE (1986). The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav. Neural Biol.* 46: 87-98.
- Goto SH, Conceição IM, Ribeiro RA & Frussa-Filho R (1993) Comparison of anxiety measured in the elevated plus-maze, open field and social interaction tests between spontaneously hypertensive rats and Wistar EPM 1 rats. *Brazilian J Med Biol Res* 26: 965-969.
- Grace AA (1991) Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity a hypotheses for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41: 1-24.
- Greden JF (1974) Anxiety or caffeinism: adiagnostic dilemma. *Am. J. Psychiatry* 131: 1089-1092.
- Greene RW & Haas HL (1991). The eletrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 36: 329-341.
- Hagger C, Buckley P, Kenny JT, Friedman L, Ubogy D, Meltzer HV (1993) Improvement in cognitive functions and psychiatric symptoms in treatment-refractory schizophrenic patients receiving clozapine. *Biol Psychiatry* 34 702-712.

- Halldner L, Lopes LV, Daré E, Lindstrom, Johansson B, Ledent C, Cunha RA & Fredholm BB (2004) Binding of adenosine receptor ligands to brain of adenosine receptor knock-out mice: evidence that CGS21680 binds to A<sub>1</sub> receptors in hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 370: 270-280.
- Handley SL, Mithani S (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 327: 1-5.
- Hauber W, Neuscheler P, Nagel J & Muller CE (2001) Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in the caudate putamen of rats. *Eur. J. Neurosci.* 14: 1287-1293.
- Hebb DO (1949). The organization of behaviour. Wiley, New York.
- Hedberg TG, Simpson GV & Stanton PK (1993). Microcircuitry of posterior cingulate cortex in vitro: Electrophysiology and laminar analysis using the current source density method. *Brain Res.* 632: 239-248.
- Hedberg TG & Stanton PK (1995) Long-term potentiation and depression of synaptic transmission in rat posterior cingulate cortex. *Brain Research* 670: 181-196.
- Horikawa K, Kinjo N, Stanley LC & Powell (1988) Topographic organization and collateralisation of the projections of the anterior and laterodorsal thalamic nuclei to cingulate areas 24 and 29 in rat. *Neurosc. Res.* 6: 31-44.
- Hyman, B.T., Van Hoesen, G.W. & Damasio, A.R. (1990) Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. *Neurology*, 40, 1721-1730.
- Ito I, Hidaka H & Sugiyama, H (1991) Effects of KN-62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin protein kinase II, on long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 121: 119-121.
- Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T (1990) Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacol* 101: 27-33.
- Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MBC & Medina JH (1992) Neurotransmitter receptors involved in memory processing by amygdala, medial septum and hippocampus of rats. *Behav. Neural. Biol.* 58: 16-26.
- Izquierdo I & Medina JH (1995a) Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and pharmacology of memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63: 19-32.
- Izquierdo I & Medina JH (1995b) Long-term potentiation and neuromodulator- and hormone-dependent processes play a role in declarative memory. In: *Brain processes*

- and memory. McGaugh JL & Ishikawa K (Eds.) Amsterdam: Elsevier, North-Holland, pp. 25-38.
- Izquierdo I & Medina JH (1997a) Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68: 285-316.
- Izquierdo I & Medina JH (1997b) The biochemistry of memory and its regulation by modulatory processes. *Psychobiology* 25: 1-9.
- Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA & Medina JH (1998) Mechanisms for memory types differ. *Nature* 18; 393(6686): 635-636.
- Izquierdo I, Schröder N, Netto CA & Medina JH (1999) Novelty causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance in rats through NMDA receptor and CaMKII-dependent mechanisms in hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 11: 3323-3328.
- Izquierdo I & McGaugh JL (2000) Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Beh. Pharmacol.* 11: 517-534.
- Izquierdo, I (2002) Memória. Ed. Artmed: São Paulo.
- Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH & Izquierdo I (2003) Exposure to novelty enhances retrieval of very remote memory in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 79: 51-56.
- Jacobson KA, Nikodijevic O, Shi D, Gallo-Rodriguez C, Olah ME, Stiles GL & Daly JW (1993) A role for central A<sub>3</sub>-adenosine receptors: mediation of behavioural depressant effects. *FEBS Lett.* 336: 57-60.
- James W (1980) The principles of Psychology. Holt: New York.
- Jeffery KJ (1997) LTP and spatial learning – where to next? *Hippocampus* 7: 95-110.
- Jockers R, Linder ME, Hohenegger M, Nanoff C, Bertin B, Strosberg AD, Marullo S & Freissmuth M (1994) Species difference in the G protein selectivity of the human and bovine A<sub>1</sub>-adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 32077-32084.
- Johansson B, Georgiev V, Parkinson FE & Fredholm BB (1993) The binding of the adenosine A<sub>2</sub> selective agonist [<sup>3</sup>H]CGS21680 to rat cortex differs from its binding to rat striatum. *Eu. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.* 247: 103-110.
- Johnason-Kozlow M, Kritz-Silverstein D, Barret-Connor E, Morton D (2002) Coffee consumption and cognitive function among older adults. *Am. J. Epidemiol.* 156: 842-850.
- Jones PA, Smith RA & Stone TW (1998) Protection against kainite-induced excitotoxicity by adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonist and antagonist. *Neuroscience* 85: 229-237.



- Kaas J, Hall WC, Diamond IT (1970) Cortical visual areas I and II in the dedgehog: relation between evoked potential maps and architectonic subdivisions, *J. Neurophysiol.* 33: 595-615.
- Kaas JH (1993) The functional organization of somatosensory cortex in primates. *Anat. Anz.* 175: 509-518.
- Kass Jh (2004) Evolution of somatosensory and motor cortex in primates. *Anat. Rec.* 281:1148-1156.
- Kemp N & Bashir ZI (1997) A role for adenosine in the regulation of long-term depression in the adult rat hippocampus in vitro. *Neurosci. Lett.* 225: 189-192.
- Khavandgar, S., Homayoun, H., Torkaman-Boutorabi, A. & Zarrindast, M.R. (2001) The effects of adenosine receptor agonists and antagonists on morphine state-dependent memory of passive avoidance. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78, 390-405.
- Kopf SR & Baratini CM (1999) Effects of posttraining administration of insulin on retention of a habituation response in mice: participation of a centrally cholinergic mechanism. *Neurobiology of Learning and Memory* 71: 50-61.
- Kopf SR, Melani A, Pedata F & Pepeu G (1999) Adenosine and memory storage: effect of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptor antagonist. *Psychopharmacology*, 146, 214-219.
- Kubota Y & Gabriel M (1995) Studies of the limbic comparator: Limbic circuit training-induced unit activity and avoidance behaviour in rabbits with anterior dorsal thalamic lesions. *Behav. Neurosci.* 109: 258-277.
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G & Permentier M (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *Nature* 388: 674-678.
- Lee C, Rodgers RJ (1990) Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacol* 102: 507-513.
- Lent R (2002) Cem Bilhões de Neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. Ed. Atheneu.
- Leung LW & Borst JGG (1987) Electrical activity of the cingulate cortex. I. Generating mechanisms and relation to behaviour. *Brain Res.* 407: 68-80.
- Linden DJ (1994) Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* 12: 457-472.
- Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92: 180-185.

- Lopes LV, Cunha RA & Ribeiro JA (1999) Interaction between adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors in the control of neurotransmitter release. In: *Recent Research Developments in Neurochemistry*, vol.2, part II, Pandalai SJ (Ed.). Trivandrum: Research Signpost, pp. 463-472.
- Maia L & mendonça A (2002) Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur. J. Neurol.* 9: 1-6.
- Malenka RC & Nicoll RA (1999) Long-term potentiation – a decade of progress? *Science* 285: 1870-1874.
- Maren S & Baudry M (1995) Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationship to learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63: 1-18.
- Martin JH (1996) *Neuroanatomy: Text and Atlas* (2<sup>o</sup> ed., p.475) Stamford: Appleton & Lange.
- McGaugh JL (2000) Memory – a Century of Consolidation. *Science* 287: 248-251.
- Mello e Souza T, Roesler R, Madruga M, de-Paris F, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Medina JH & Izquierdo I (1999). *Neurobiol. of Learn. and Memory* 72: 118-127.
- Meyer L, Caston J (2004) Stress alters caffeine action on investigatory behaviour and behavioural inhibition in the mouse. *Behav. Brain Res.* 149: 87-93.
- Meyerhof W, Müller-Brechlin R & Richter D (1991) Molecular cloning of a novel putative G-protein coupled receptor expressed during rat spermiogenesis. *FEBS Lett.* 284: 155-160.
- Moon-Puc RE, Góngora-Alfaro JL, Alvarez-Cevera FJ, Pineda JC, Arankowsky-Sandoval G & Heredita-López F (2003) Caffeine and muscarinic antagonists act in synergy to inhibit haloperidol-induced catalepsy. *Neuropharmacology* 45: 493-503.
- Morelli M, Pinna A (2001) Interaction between dopamine and adenosine A<sub>2A</sub> receptors as a basis for the treatment of parkinson's disease. *Neurol. Sci.* 22: 71-72.
- Morgado I. (1999) Aprendizaje y memoria: conceptos, categorías y sistemas neurales. In: *Neuroanatomía y fisiología das funciones cerebrales*. Ed. Madrileña. Cap.32. p.827-873.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP & O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297: 681-683.
- Morris RGM, Anderson E, Lynch GS & Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319: 774-776.

- Nanoff C, Mitteraeur T, Roka F, Hohenegger M & Freissmuth M (1995) Species differences in A<sub>1</sub> adenosine receptor/G protein coupling: identification of a membrane protein that stabilizes the association of the receptor/G protein complex. *Mol. Pharmacol.* 48: 806-817.
- Norenberg W, Wirknerk K, Assmann H & Richter M & Illes P (1998) Adenosine A<sub>2A</sub> receptors inhibit the conductance of NMDA receptor channels in rat neostriatal neurons. *Amino Acids* 14: 33-39.
- Normile HJ & Barraco RA (1991). N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A<sub>1</sub> receptors. *Brain Res. Bull.* 27(1): 101-104.
- Nowakowska E, Chodera A, Kus K, Rybakowski J (1999) Some behavioral effects of risperidone in rats: comparison with haloperidol. *European Neuropsychopharmacology* 9: 421-426.
- Nowakowska E, Chodera A, Kus & Rybakowski J (1999) Some behavioral effects of risperidone in rats: comparison with haloperidol. *European Neuropsychopharmacol.* 9: 421-426
- O'Kane EM & Stone TW (1998) Interaction between adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor-mediated responses in the rat hippocampus in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 362: 17-25.
- O'Keefe J & Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* 34: 171-175.
- Ohno M & Watanabe S (1996) Working memory failure by stimulation of hippocampal adenosine A<sub>1</sub> receptors in rats. *Neuroreport* 7: 3013-3016.
- Papez JW (1937) A proposed mechanism of emotion. *Arch. Neurol. Psych.* 38: 725-743.
- Paxinos G & Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates (2<sup>nd</sup> ed.). San Diego: Academic Press, 1986.
- Pavlov, I.P. (1927) Conditioned reflexes. London: Oxford UP.
- Pellow S, Chopin P, File SE & Briley M (1985) Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14, 149-167.
- Pereira GS, Melo e Souza T, Vinadé ERC, Choi H, Rodrigues C, Battastini AMO, Izquierdo I, Sarkis JJF & Bonan CD (2002) Blockade of adenosine A<sub>1</sub> receptors in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, 437 (3), 151-154.
- Ploeger GE, Spruijet BM & Cools AR (1992) Effects of haloperidol of the acquisition of a spatial learning task. *Physiol. Behav.* 52: 979-983.

- Pontecorvo MJ, Clissold DB, White MF & Ferkany JW (1991) *N*-methyl-*D*-aspartate antagonists and working memory performance: comparison with the effects of scopolamine, propranolol, diazepam, and phenylisopropyladenosine. *Behav. Neurosci.* 105: 521-535.
- Proctor WR & Dunwiddir TV (1987) Pre- and post-synaptic actions of adenosine in the in vitro hippocampus. *Brain Res.* 426: 187-190.
- Ralevic V & Burnstock B (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492.
- Ramón Y Cajal (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres.* Paris.
- Ribeiro JA, Sebastião AM & de Mendonça A (2003) Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect.* 16, 80-86.
- Richardson PJ, Kase H & Jenner PG (1997) Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists as new agents for the treatment of parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 18: 338-344.
- Riedel G (1996) Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. *Trends Neurol. Sci.* 19: 219-224.
- Riekkinen P Jr, Kuitunen J & Riekkinen M (1995) Effect of scopolamine infusions into anterior and posterior cingulate on passive avoidance and water maze navigation. *Brain Res.* 685: 46-54.
- Rodgers RJ, Lee C, Shepherd JK (1992) Effects of diazepam on behavioral and antinociceptive responses to elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacol* 106: 102-110.
- Rosengarten H, Quartermain D (2002) Effect of prenatal administration of haloperidol, risperidone, quetiapine and olanzapine on spatial learning and retention in adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 72: 575-579.
- Salvatore CA, Jacobson KA, Taylor HE, Linden J & Johnson RG (1993) Molecular cloning and characterization of the human A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 10365-10369.
- Santos PF, Caramelo OL, Carvalho AP & Duarte CB (1998) Modulation of [<sup>3</sup>H]acetylcholine release from cultures amacrine-like neurons by adenosine A<sub>1</sub> receptors. *J. Neurochem.* 71: 1086-1094.
- Schacter DL (1987) Implicit memory: a new frontier in cognitive neuroscience. *J. Exp. Psychol (Learn Mem Cogn)* 13: 501-518.

- Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE (1999) Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent upon protein synthesis, PKA and MAP kinase. *Learning and Memory* 6: 97-110.
- Sebastião AM & Ribeiro JA (1996) A<sub>2</sub> receptor mediated excitatory actions of adenosine in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 48: 167-189.
- Sebastião AM & Ribeiro JA (2000) Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *TIPS* 21: 341-345.
- Sharma T (1999) Cognitive effects of conventional and atypical antipsychotics in schizophrenia. *Br J Psychiatry* 38 44-51.
- Shibata H (1993) Efferent projections from the anterior thalamic nuclei to cingulate cortex in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 330: 533-542.
- Silva AJ, Elgersma Y & Costa RM (2000) Molecular and cellular mechanisms of cognitive function: implications for psychiatric disorders. *Biology Psychiatry* 47: 200-209.
- Sutherland RJ & Hoising JM (1993) Posterior cingulate cortex and spatial memory: A microlimnology analysis. In: *Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus: A comprehensive treatise*. Vogt BA & Gabriel M (Eds.), Boston: Birkhauser.
- Suzuki F, Shimada J, Shiozaki S, Ichikawa S, Ischii A, Nakamura J, Nonaka H, Kobayashi H & Fuse E (1993). Adenosine-A<sub>1</sub> antagonists III. Structure-activity relationships on amelioration against scopolamine or N<sup>6</sup>-(R)-phenylisopropyl)adenosine-induced cognitive disturbance. *J.Med.Chem.* 36: 2508-2518.
- Svenningsson P & Fredholm BB (1997) Glucocorticoids regulate the expression of adenosine A<sub>1</sub> but not A<sub>2A</sub> receptors in rat brain. *J. Pharmacol., Exp. Ther.* 280: 1094-1101.
- Svenningsson P, Hall H, Sedvall G, Fredholm BB (1997) Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse* 27: 322-335.
- Thompson SM, Hass HL & Gahwiler BH (1992) Comparison of the actions of adenosine at pre- and post-synaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol* 451: 347-363.
- Turabalda AV, Leite-Morris KA, Kaplan GB (2004) Antipsychotics regulate cyclic AMP-dependent protein kinase and phosphorylated cyclic AMP response element-binding protein in striatal and cortical brain regions in mice. *Neuroscience Letters* 357: 53-57.
- Van Hoesen GW (1985) Neural systems of the non-human primate forebrain implicated in memory. *Annual New York Academy Science*, 444, 97-112.

- Vianna MRM, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH & Izquierdo I (2000). Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat, *Learning and Memory* 7: 333-340.
- Vianna MRM, Izquierdo LA, Barros DM, Souza MM, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Medina JH & Izquierdo I (2001) Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 233-240.
- Vogt BA, Rosene DL & Peters A (1991) Synaptic termination of thalamic and callosal afferents in cingulate cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 201: 265-283.
- Von Lubitz DKJE, Paul IA, Bartus RT & Jacobson KA (1993) Effects of chronic administration of adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist and antagonist on spatial learning and memory. *Eur.J.Pharmacol.* 249: 271-280.
- Wardas J, Konieczny J, Lorenc-Koci E (2001) SCH 58261, an A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonist, counteracts parkinsonian-like muscle rigidity in rats. *Synapse* 41: 160-171.
- Weber RG, Jones CR, Lohse MJ & Palacios JM (1990) Autoradiographic visualization of A<sub>1</sub> adenosine receptors in rat brain with [<sup>3</sup>H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine. *J. Neurochem.* 54: 1344-1353.
- Whishaw IQ, Mittleman G, Bunch ST, Dunnett SB (1987) Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudate-putamen lesions in rats. *Behav. Brain Res.* 24: 125-138.
- Wu LG & Saggau P (1994) Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. *J. Neurosci.* 14(9): 5613-5622.
- Xavier GF (1982) A aprendizagem da esquiva. I. Aspectos históricos. *Ciência e Cultura*, 34(11): 1443-1453.
- Yawo H & Chuhma N (1993) Preferential inhibition of omega-conotoxin-sensitive presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels by adenosine autoreceptors. *Nature* 365 (6443): 256-258.
- Zarrindast MR & Shafaghi B (1994) Effects of adenosine agonists and antagonists on acquisition of passive avoidance learning. *Eur. J. Pharmacol.* 256: 233-239.
- Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL & Civelli O (1992) Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 89: 7432-7436.

Zilles K & Wree A (1995) Cortex: Areal and laminar structure. In: *The rat nervous system*. Paxinos G (Ed.). San Diego: Academic press.

Artigos publicados ou em preparação no período vigente do doutorado

- Rossato ER, Silva LB, Pereira GS, Bonan CD, Battastini AMO, Ribeiro JP, Sarkis JJF (2003) ATP diphosphohydrolase in human platelets from patients with coronary arteries heart disease. *Platelets* 14: 47-52.
- Luft T, Pereira GS, Cammarota M, Izquierdo I (2004) Effects of bicuculline in hippocampus, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory* 82: 52-56.
- Görgen M, Turatti K, Medeiros AR, Buffon A, Bonan CD, Sarkis JJF, Pereira GS (2005) Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* decrease nucleotides hydrolysis in rat blood serum. *Journal of Ethnopharmacology* 10: 73-77.
- Rücker B, Pereira GS, Fürstenau CR, Izquierdo I, Bonan CD, Sarkis JJF (2005) Inhibitory avoidance task reveals differences in ectonucleotidases activities between male and female rats. *Neurochemical Research*, *in press*.
- Görgen M, Turatti K, Medeiros AR, Rücker B, Sarkis JJF, Pereira GS (2005) Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* decreases nucleotide hydrolysis in blood serum of female rat ovariectomy, *em preparação*.