

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BIOQUÍMICA

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO CRÔNICO COM CAFEÍNA EM
MODELOS ANIMAIS DE ESQUIZOFRENIA:
PARÂMETROS COGNITIVOS E COMPORTAMENTAIS

RICARDO VÍGOLO DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Diogo Rizzato Lara

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas – Bioquímica, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, janeiro de 2005.

DEDICATÓRIA

Eu dedico esta dissertação de mestrado ao meu amigo Dioguinho Lara, por ser, no meu ponto de vista, quem melhor tem condições de compreender o valor que este trabalho tem para mim, em todos os (amplos) sentidos. Minha trajetória tem nuances que somente olhos bem abertos e sensíveis podem perceber, e ele os tem. O resultado disso é que ele conseguiu mudar minha concepção a respeito de vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos “*meus queridos e amados escravos*” Juliana, Paulinho, e Márcio, pela persistência, paciência e dedicação ao abrirem mão de alguns finais de semana para que uma das etapas mais trabalhosas deste trabalho pudesse ser concluída com o êxito com que foi concluída.

Aos meus queridos colegas dos laboratórios 24, 26 e 28, Rô, Gi, Sayuri, Bibi, Ana Top Elisa, Vanessa *Super-Chique*, le Jean Pierre, von Roska, *Phélix*, Débis (dra. *Lloyd!*) e especialmente à Carina, a minha primeira grande amiga, pelos fortes laços afetivos no ambiente de trabalho, que são tão importantes para mim.

Ao Adriano (*bróóóther!!!*) parceiro e grande querido amigo, pelas aulas primordiais que serviram para me situar num oceano de conhecimento que, no início, era completamente novo.

Ao super IC Oscar, por, além de ser um amigo querido e colaborador deste trabalho, desempenhar papel de meu co-orientador.

Ao grupo do Diogo Lara, como um todo, pela maravilhosa acolhida nos momentos difíceis da minha caminhada em direção ao título de Mestre.

Ao querido Mestre e orientador Diogo Lara, por me convidar para participar disso tudo, dando-me a oportunidade de ampliar meu horizonte de conhecimentos. E por me manter firme nos momentos em que eu não me sentia firme para continuar.

Ao Prof., Dr., Mestre da ciência e da facécia da vida e, acima de tudo, grande criador de versinhos, Diogo Onofre, por propiciar um ambiente de trabalho tão maravilhoso que faz com que minha realização profissional seja digna de privilegiado.

À Psicóloga Jacqueline M^a *Kelly* Klein, minha colega, sócia e superamiga pós-moderna, pelos votos de boa sorte para entrevista de seleção de mestrado e por me acompanhar durante todo esse tempo, sempre torcendo por mim.

E, finalmente, aos meus amados familiares (*Uénzinha, você é minha parente!*) que tiveram que agüentar alguns brevíssimos momentos de leve ou levíssima irritabilidade, principalmente meus pais queridos – os melhores que eu já tive em toda a minha vida! – Diva e Orlando, os quais eu amo muito, muito mesmo!

ABREVIATURAS

5'N: 5'-nucleotidase

A₁R: receptor A₁

A_{2A}R: receptor A_{2A}

Ado deam: adenosina deaminase

ADP: adenosina difosfato

AMP: adenosina monofosfato

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolpropionato

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

AQ: adenosina quinase

ATP: adenosina trifosfato

Ca²⁺: íon cálcio

DSM-IV: *Diagnostic and Statistical Manual*

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

HGPRT: hipoxantina guanina fosforribosil transferase

IMP: inosina monofosfato

IPP: inibição pré-pulso

K⁺: íon potássio

KA: cainato

Mg²⁺: íon magnésio

mGLU: receptores glutamatérgicos metabotrópicos

Na⁺: íon sódio

NMDA: N-metil-D-aspartato

PCP: fenciclidina

PDE: fosfodiesterase

PET: tomografia por emissão de pósitrons

PNP: fosforilase de nucleosídeo purínico

PRPP: 5-fosforribosil- α -pirofosfato

SAHH: S-adenosil-homocisteína hidrolase

SNC: sistema nervoso central

SUMÁRIO

	Página
I. RESUMO	viii
II. ABSTRACT	x
III. INTRODUÇÃO	01
1. Definição clínica de esquizofrenia	01
2. Bases neuroquímicas da esquizofrenia	02
a) <i>O sistema dopaminérgico</i>	02
b) <i>O sistema glutamatérgico</i>	03
c) <i>O sistema purinérgico</i>	05
3. Cafeína como antagonista adenosinérgico	12
IV. OBJETIVOS	14
1. Objetivos específicos	14
V. MANUSCRITO DO ARTIGO	16
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
VII. CONCLUSÕES	37
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
IX. ANEXO	46

I. RESUMO

A esquizofrenia envolve um conjunto de sintomas de sensopercepção, cognição e afeto que compromete significativamente a vida do sujeito. O mais aceito modelo para se entender essa doença é o modelo de hiperatividade dopaminérgica, pois drogas como anfetamina e cocaína, que aumentam a atividade dopaminérgica, mimetizam alguns sintomas dessa patologia, e os fármacos usados para o tratamento são os que bloqueiam os receptores de dopamina.

Além da dopamina, o sistema glutamatérgico também tem sido relacionado à esquizofrenia, pelo fato de antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, tais como PCP, MK-801 e cetamina, provocarem alguns sintomas dessa doença, como desorganização cognitiva e delírios em pessoas saudáveis.

A adenosina, por sua vez, desempenha um papel neuromodulatório tanto da atividade dopaminérgica quanto da atividade glutamatérgica, inibindo o tônus de ambos neurotransmissores por diferentes vias. Assim, sugerimos que antagonistas de receptores adenosinérgicos, como a cafeína, também seriam um modelo farmacológico para a doença. Com base nisso, demonstramos previamente que camundongos tratados cronicamente com cafeína desenvolvem tolerância cruzada ao efeito do antagonista NMDA MK-801 em provocar hiperlocomoção, mas não em seu déficit cognitivo na esQUIVA INIBITÓRIA. Buscando ampliar e melhor caracterizar essa interação, os seguintes parâmetros foram avaliados em camundongos: atividade locomotora realizando-se as curvas de dose e de tempo; memória de trabalho, avaliada na tarefa de alternância tardia; memória de longa duração, avaliada na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA e a avaliação de ataxia.

Os resultados nos mostraram que camundongos subcronicamente tratados com cafeína na bebida (1 mg/mL, por 1, 3, ou 7 dias) apresentaram habituação semelhante entre os grupos e que MK-801 (0,25 mg/kg, i.p.) produziu hiperlocomoção nos animais tratados com água e 1 dia de cafeína, com efeito diminuído depois de 3 dias e praticamente abolido depois de 7 dias. Depois de 7 dias, o efeito também foi dose-dependente, sem tolerância cruzada na dose de 0,1 mg/mL,

intermediária na dose de 0,3 mg/mL e total a 1,0 mg/mL. Os escores de ataxia induzidos por 0,5 mg/kg de MK-801 não foram afetados pelo tratamento com cafeína por 7 dias a 1 mg/mL, mas uma hiperlocomoção transitória foi observada. O tratamento com cafeína por 7 dias a 1 mg/mL preveniu os déficits induzidos por 0,01 mg/kg de MK-801 na tarefa de esquiva inibitória e os atenuou, a 0,4 mg/kg de MK-801, na tarefa de alternância tardia, no labirinto em T.

Conclui-se, então, que a hiperlocomoção e os déficits cognitivos – mas não a ataxia – induzidos por MK-801 podem estar influenciados pela atividade reduzida da adenosina. Assim, os estudos sobre a ação da adenosina podem se fazer relevantes para a melhor compreensão da neurobiologia da esquizofrenia. Estes resultados são concordantes com o novo modelo proposto, que é o de hipofunção adenosinérgica na esquizofrenia.

II. ABSTRACT

Schizophrenia is a mental disorder, which comprises several symptoms of perception, cognition and affect that impair the subject's life. The most accepted model to understand this disease is dopaminergic hyperactivity, since dopaminergic agonists, as amphetamine or cocaine, increase its activity, mimicking some symptoms, and the pharmacological treatment is by blocking dopamine receptors.

Furthermore, the glutamatergic system has been associated to schizophrenia, since NMDA antagonists, as PCP, MK-801 and ketamine, may provoke several symptoms of this disease, such as cognitive impairments and delusions in healthy individuals.

The neuromodulator adenosine exerts a neuromodulatory role on both dopaminergic and glutamatergic systems, decreasing their activity. Thus, we have suggested that adenosine receptor antagonists, such as caffeine, could be a model of schizophrenia. Based on this hypothesis, we have demonstrated the mice chronically treated with caffeine develop cross tolerance for the effect of the NMDA antagonist MK-801 in locomotion, but not in cognitive deficit in inhibitory avoidance task. In order to further characterize this interaction, the following parameters have been evaluated in mice: locomotor activity with time and dose curves; working memory in the delayed alternation task, long-term memory in the inhibitory avoidance task and ataxia.

The results show that mice subchronically treated with caffeine in drinking solution (1 mg/mL for 1, 3 and 7 days) and control group presented similar habituation, and MK-801 (0.25 mg/kg i.p.) produced hyperlocomotion in mice treated with water and 1 day of caffeine, but this effect was diminished after 3 and almost abolished after 7 days. After 7 days of caffeine treatment, the effect was also dose-dependent, with no effects of 0.1 mg/mL, an intermediate effect at 0.3 mg/mL and complete tolerance at 1.0 mg/mL. Ataxia scores induced by 0.5 mg/kg MK-801 were not affected by caffeine treatment for 7 days at 1 mg/mL, but a short-lived hyperlocomotor effect was observed. Performance deficit in the inhibitory avoidance task induced by MK-801 (0.01

mg/kg) was prevented in mice subchronically treated with caffeine for 7 days at 1 mg/mL, whereas cognitive impairments in the delayed alternation task, in the T-maze, by MK-801 (0.4 mg/kg) were attenuated by such caffeine treatment.

We concluded that hyperlocomotion and cognitive effects, but not ataxia, induced by MK-801 might be influenced by reduced adenosinergic activity. Therefore, studies on adenosine activity may be relevant to the comprehension of the neuropathology of schizophrenia. These findings agree with a model of adenosine hypofunction in schizophrenia.

III. INTRODUÇÃO

A presente dissertação irá abordar parte da interação existente entre diferentes neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC), principalmente dos sistemas purinérgico, glutamatérgico e dopaminérgico, que são vias de neurotransmissores relacionadas à esquizofrenia (Lara e Souza, 2000). O trabalho experimental foi realizado utilizando modelos comportamentais em camundongos, que classicamente têm sido utilizados para melhor compreender a patofisiologia adjacente às psicoses e possibilitado novos tratamentos. No que se segue, serão introduzidos os principais conceitos referentes à esquizofrenia e às vias de neurotransmissores envolvidas, com particular ênfase à interação adenosina-glutamato.

1. DEFINIÇÃO CLÍNICA DE ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é caracterizada por um conjunto de sintomas que comprometem a cognição, o afeto, a percepção da realidade, a comunicação e o relacionamento interpessoal, além da capacidade de sentir prazer. Sintomas como delírios bizarros são especialmente característicos da patologia (Stahl, 2002).

De acordo com o **DSM-IV** (Manual Estatístico e de Diagnóstico de doenças mentais), os sintomas da esquizofrenia podem ser enquadrados em duas amplas categorias, ditos *positivos* e *negativos*. Os primeiros refletem um excesso ou distorções nas funções normais, como os delírios, as alucinações, a desorganização do discurso e/ou do comportamento. Já os sintomas negativos caracterizam-se por uma diminuição ou até mesmo perda das funções normais, como amplitude ou intensidade da expressão emocional (embotamento afetivo), fluência e produtividade do pensamento (alogia), iniciação de comportamentos dirigidos a um objetivo (avolia) e falta de prazer (anedonia). Os sintomas positivos são:

- ↪ Delírios: são distorções ou exageros nas interpretações das percepções ou experiências e no pensamento inferencial. Pode ser de natureza persecutória (a mais comum, na qual a pessoa acredita estar sendo atormentada, seguida, enganada, espionada ou ridicularizada), de referência (também bastante comuns – a pessoa crê que certos gestos, comentários, passagens de livros, jornais e outros indicadores ambientais são dirigidos à sua pessoa), religiosas ou de grandiosidade. São distorções cognitivas.
- ↪ Alucinações: são alterações perceptuais. Por definição, alucinações ocorrem em qualquer modalidade sensorial, mas a auditiva é a mais característica da esquizofrenia. São experimentadas como vozes distintas dos próprios pensamentos e são de conteúdo bastante variável, ainda que as pejorativas e ameaçadoras sejam bastante comuns. Certos tipos de alucinações auditivas são bastante características, como a de duas vozes comentando sobre os pensamentos e comportamentos do sujeito. Além dessas características, as alucinações devem ocorrer num contexto de percepção sensorial claro, e não em estados de transição entre sono e vigília, situação em que estariam dentro da faixa de experiências normais. Também não se configuram como alucinações características da esquizofrenia as experiências que não possuem a qualidade de percepção externa (como zumbidos na própria cabeça), que fazem parte de um contexto cultural (como experiência religiosa) ou experiências isoladas de ouvir o próprio nome sendo chamado.

2. BASES NEUROQUÍMICAS DA ESQUIZOFRENIA

a) O sistema dopaminérgico

Os neurônios dopaminérgicos localizam-se, predominantemente, nos sistemas túberoinfundibular, nigroestriatal, mesolímbico e mesocortical (Kandel et al, 2000).

A hiperativação das células do sistema mesolímbico são as mais relacionadas com a sintomatologia positiva da doença (Carlsson, 1974). Achados mais recentes, com auxílio de imagem

por tomografia por emissão de pósitrons – PET – confirmaram essa hipótese (Laruelle, 1998). Já os neurônios do sistema mesocortical poderiam ser responsáveis pelos aspectos de natureza mais cognitiva da patologia. Esses seriam os déficits típicos, como falta de motivação para iniciar comportamentos, planejamento de atividades, atenção, dentre outros. Suas vias se projetam para o neocórtex, principalmente o córtex pré-frontal. Outros estudos (Weinberger, 1987) apontam para um desbalanço na transmissão dopaminérgica, ao invés de uma simples hiperatividade. Esse desbalanço prejudicaria o sistema de retroalimentação entre o córtex pré-frontal e as vias mesolímbicas e, conseqüentemente, causaria uma hiperatividade das vias mesolímbicas. Experimentalmente, há evidências de que lesões químicas dos neurônios das vias mesocorticais de animais aumentarem a responsividade sináptica nas vias mesolímbicas, especificamente em terminações no *núcleo accumbens* (Pycock et al, 1980).

Um dos indicativos clínicos que reforçam essa hiperfuncionalidade dá-se pela análise dos mecanismos de ação das drogas antipsicóticas, que são bloqueadores de receptores do tipo D₂, assim como D₃ e, em alguns casos, D₄. Acredita-se que esse tipo de tratamento não trate a causa primária, mas apenas compense a hiperatividade dopaminérgica mesolímbica.

b) O sistema glutamatérgico

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e está presente na maioria das sinapses (Shigeri et al, 2004; Ozawa et al, 1998). Além do seu papel fundamental em vários processos fisiológicos (como aprendizado e memória), em situações patológicas (como doenças neurodegenerativas e isquêmicas), a hiperativação do sistema glutamatérgico, como observado no excesso de glutamato liberado, leva à toxicidade celular, chamada de excitotoxicidade (Lipton e Rosemberg, 1994).

Os receptores glutamatérgicos podem ser classificados em dois grandes grupos: ionotrópicos, que são canais iônicos dos tipos NMDA e não-NMDA, sendo estes subdivididos em AMPA e cainato (KA); ou metabotrópicos (mGLU), que são acoplados a sistemas de segundos

mensageiros através de proteínas G (Shigeri et al, 2004; Ozawa et al, 1998). A ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos por glutamato regula fluxos iônicos transmembrana, e a ativação de receptores metabotrópicos modula a atividade de várias enzimas, como adenilato ciclase, guanilato ciclase, fosfolipase C e seus respectivos segundos mensageiros, como AMPc, GMPc, diglicerídios e fosfo-inositóis.

Os receptores ionotrópicos do tipo NMDA são canais com grande permeabilidade a Ca^{2+} e baixa permeabilidade a Na^+ e K^+ , além de apresentarem uma cinética de abertura lenta. O complexo desse receptor apresenta diversos sítios de modulação da abertura do canal: um sítio para glutamato ou NMDA, um sítio para o co-agonista glicina (insensível a estriçnina), um sítio dentro do canal sensível à união de bloqueadores (PCP, MK-801, cetamina), um sítio para poliaminas e sítios para zinco e magnésio (Ozawa et al, 1998). Quando a membrana neuronal está em repouso, o canal do receptor NMDA encontra-se bloqueado por Mg^{2+} . Tanto a ativação do receptor NMDA quanto o influxo de íons só ocorrem se a membrana neuronal for previamente despolarizada, por exemplo, através dos receptores AMPA, permitindo a saída do Mg^{2+} do canal. Os receptores AMPA medeiam a neurotransmissão rápida e são canais com alta permeabilidade a Na^+ e K^+ , com menor permeabilidade a Ca^{2+} , enquanto os receptores do tipo KA são bastante permeáveis a Ca^{2+} (Shigeri et al, 2004).

Os receptores mGLU são divididos em três grandes grupos (I, II e III), de acordo com sua seqüência de aminoácidos, afinidade por ligantes e segundos mensageiros acoplados (Ozawa et al, 1998). Eles estão localizados em terminais pré- e pós-sinápticos e nas células gliais, e sua ativação pode promover efeitos inibitórios ou excitatórios. Uma das funções dos receptores pré-sinápticos é modular a liberação de glutamato (Pin e Duvoisin, 1995).

O sistema glutamatérgico tem sido implicado na patofisiologia da esquizofrenia devido ao fato de antagonistas de receptores NMDA, tais como PCP, MK-801 e cetamina, induzirem os diversos sintomas desta doença (desorganização cognitiva, delírios e embotamento afetivo) em pessoas saudáveis (Olney et al, 1999). Além disso, a glicina (Heresco-Levy et al, 1999) e D-

cicloserina (Heresco-Levy et al, 2002), que ativam o receptor NMDA, atenuam alguns sintomas da esquizofrenia, principalmente os negativos.

Um possível entendimento para essa interação é de que os receptores NMDA, presentes nas terminações dos axônios dopaminérgicos no córtex pré-frontal, quando bloqueados por antagonistas de receptores NMDA, inibiriam a liberação de dopamina nessas vias, baixando o tônus dopaminérgico nas vias mesocorticais. Ao contrário, porém, nas terminações dopaminérgicas do *núcleo accumbens* essas drogas aumentariam a liberação de dopamina e inibiriam sua recaptação, tendo um efeito muito semelhante ao das anfetaminas. Esses dados indicam que o quadro esquizofrênico pode estar relacionado a diversos sistemas de neurotransmissão e de diferentes maneiras, os quais agiriam em paralelo ou em combinação com as vias dopaminérgicas.

c) O sistema purinérgico

O sistema purinérgico conta com dois efetores principais: o neurotransmissor excitatório *ATP* (adenosina trifosfato) e o neuromodulador inibitório *adenosina* (Ralevic e Burnstock, 1998). O *ATP*, além de ser fundamental no metabolismo energético celular, também é estocado em vesículas pré-sinápticas e liberado após despolarização neuronal, atuando em receptores ionotrópicos e metabotrópicos do tipo P_2 (Ralevic e Burnstock, 1998). A adenosina age nos receptores do tipo P_1 , que são subdivididos em A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (Brundege e Dunwiddie, 1997). Por não ser estocada em vesículas no terminal pré-sináptico, a adenosina não é considerada um neurotransmissor. No entanto, a adenosina pode chegar à fenda sináptica a partir: a) da degradação do *ATP* extracelular, promovida por ecto-nucleotidases (Zimmermann, 1996) b) da liberação direta promovida por transportadores bidirecionais, que também têm a função de captar a adenosina extracelular e c) da conversão de *AMPc* extracelular em adenosina, também efetuada por ecto-enzimas (Brundege e Dunwiddie, 1997) (figura 1).

Em situações fisiológicas, uma vez captada pelos transportadores de nucleosídeos, a adenosina forma, preferencialmente, nucleotídeos novamente via adenosina quinase. Entretanto,

cerca de 10% pode ser deaminada pela enzima adenosina deaminase, que também é encontrada na membrana celular e age como ecto-enzima (Brundege e Dunwiddie, 1997). Em situações de hipóxia, a hidrólise do ATP intracelular pode aumentar dramaticamente a concentração de adenosina, que se equilibra com o meio extracelular através dos transportadores bidirecionais.

Os receptores A₁ são amplamente distribuídos no sistema nervoso e inibem a liberação de vários transmissores, como o glutamato, acetilcolina e a dopamina, e inibem a atividade neuronal em nível pós-sináptico por hiperpolarização (Brundege e Dunwiddie, 1997). Já os receptores A_{2A} apresentam um importante efeito modulatório inibitório sobre o sistema dopaminérgico (Ferre et al, 1991), estando em grande parte co-localizados com receptores do tipo D₂ (Rimondini et al, 1997). Em estudos comportamentais, observou-se que agonistas dos receptores A₁ produzem efeitos anticonvulsivantes, ansiolíticos e sedativos (Brundege e Dunwiddie, 1997). Quanto aos receptores A_{2A}, seus agonistas têm um perfil principalmente de depressor da locomoção, indutor de catalepsia e compatível com ação antipsicótica (Rimondini et al, 1997), enquanto os antagonistas apresentam ação antiparkinsoniana e indutores de locomoção (Bibbiani et al, 2003). Os camundongos sem este receptor (*knock-out*) são mais agressivos e ansiosos (Ledent et al, 1997). As funções dos receptores A_{2B} e A₃ são menos conhecidas. Os receptores A_{2B}, por terem uma afinidade menor pela adenosina, parecem ser ativados somente em situações de aumento da concentração da adenosina extracelular, como hipóxia e durante convulsões (Ralevic e Burnstock, 1998). Já os receptores A₃ têm alta afinidade pela adenosina e sua densidade no cérebro é baixa, comparada aos outros receptores, mas suficiente para que administração de um agonista seletivo induza depressão locomotora (Ralevic e Burnstock, 1998).

Figura 1

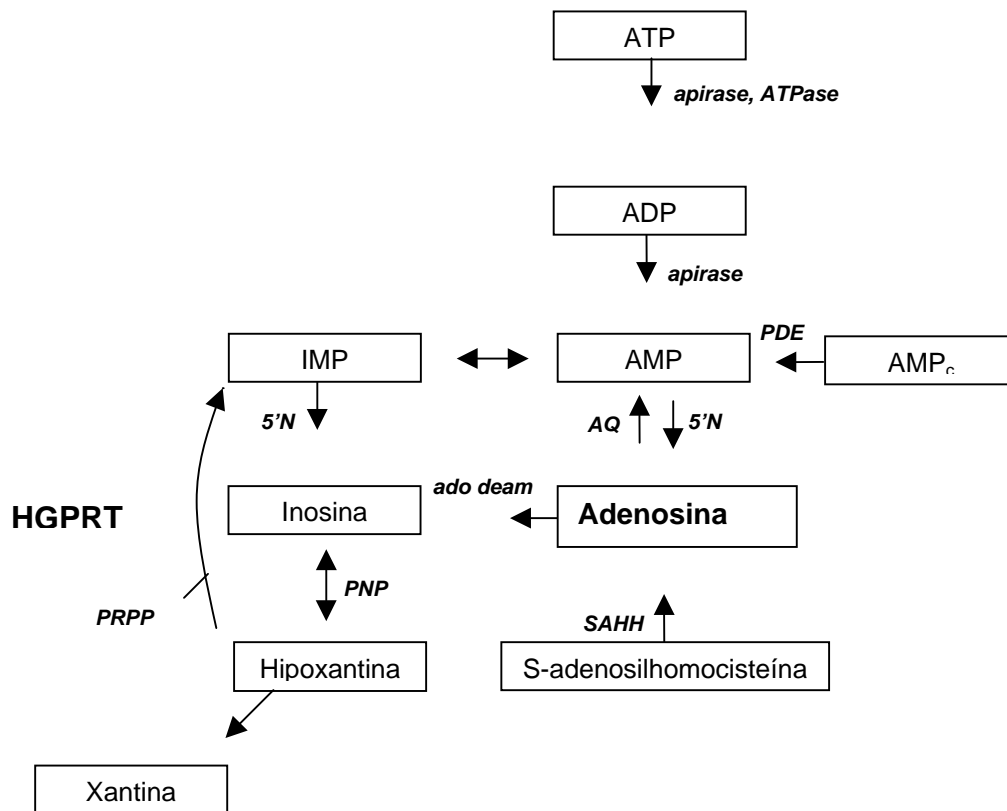


Fig.1 – Metabolismo de purinas, com enfoque na formação da adenosina: As enzimas principais estão em *itálico*: 5'-N = 5'-nucleotidase; *ado deam* = adenosina deaminase; *AQ* = adenosina quinase; *PNP* = fosforilase de nucleosídeo purínico; *HGPRT* = hipoxantina guanina fosforibosil transferase; *PDE* = fosfodiesterase; *SAHH* = S-adenosilhomocisteína hidrolase.

A modulação dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico pela adenosina

A adenosina é um importante modulador endógeno da atividade glutamatérgica, inibindo a liberação pré-sináptica de glutamato e também a sua ação pós-sináptica, por hiperpolarização neuronal (Brundege e Dunwiddie, 1997). Estas ações conferem à adenosina um papel neuroprotetor endógeno, pois seus níveis também se elevam em situações de excitotoxicidade (como em doenças

neurodegenerativas, isquemia cerebral e epilepsia) (Brundege e Dunwiddie, 1997; Ralevic e Burnstock, 1998), onde há uma hiperatividade glutamatérgica (Lipton e Rosenberg, 1994).

Os receptores A_1 são os mais abundantes e amplamente expressos inibidores acoplados a proteínas G no cérebro (Rivkees et al, 1995). Conforme dito anteriormente, a ativação dos receptores A_1 inibe a liberação de vários neurotransmissores, tais como glutamato, dopamina, serotonina e acetilcolina. Além disso, diminui a atividade neuronal por hiperpolarização pós-sináptica (Dunwiddie e Masino, 2001). Essas ações neuromodulatórias, sob condições fisiológicas, podem ser separadas do papel da adenosina como um regulador homeostático de atividade cerebral sob condições de estresse ou patofisiológicas (Cunha, 2001), quando a adenosina, formada da quebra do ATP intracelular, é liberada e inibe a excitotoxicidade neural pela atividade glutamatérgica. Isso ocorre porque, além da adenosina inibir a liberação de glutamato, este promove a liberação de adenosina (Hoehn e White, 1990; Hoehn et al, 1990; Craig e White, 1993). A liberação de adenosina pela ativação glutamatérgica (principalmente via receptores NMDA) parece ser relevante biologicamente (Manzoni et al, 1994) e isso poderia mediar alguns efeitos inibitórios induzidos por agonistas NMDA, como, por exemplo, a depressão locomotora (Gimenez-Llort et al; 1995).

No que diz respeito aos receptores A_{2A} e D_2 , estes são co-localizados em neurônios GABAérgicos do *striatum*, formando complexos funcionais heteroméricos com ações opostas (Ferre, 1997; Hillion et al, 2002). A ativação dos receptores A_{2A} diminui a afinidade dos receptores D_2 por dopamina, sem alterar sua afinidade por antagonistas de receptores D_2 de dopamina. Pré-clinicamente, os agonistas de receptores A_{2A} exercem atividades similares às de antipsicóticos e efeitos catalépticos, enquanto antagonistas aumentam a locomoção e têm efeitos anti-parkinsonianos (Ferre, 1997).

A hipótese purinérgica da esquizofrenia

Baseados na atividade neuromodulatória da adenosina, nosso grupo propôs que um déficit na atividade adenosinérgica é consistente com muitos aspectos da doença e com os achados relativos aos sistemas dopaminérgicos e glutamatérgicos (Lara e Souza, 2000).

Atualmente, o modelo mais aceito para se entender o desbalanço neuroquímico na esquizofrenia é o modelo de hiperfunção dopaminérgica. Contudo, achados diretos que envolvem o sistema dopaminérgico na esquizofrenia também são compatíveis com déficits na atividade adenosinérgica. O aumento basal na ocupação dos receptores D_2 de dopamina em pacientes esquizofrênicos (Abi-Dargham et al, 2000) pode estar relacionado a uma diminuição dos efeitos dos receptores A_{2A} sobre os receptores D_2 , fazendo com que sua afinidade à dopamina fique aumentada (Ferre et al, 1991).

Portanto, se o tônus adenosinérgico estiver diminuído na esquizofrenia, é de se esperar que antagonistas de receptores adenosinérgicos, tais como cafeína e teofilina, mimetizem determinadas características da doença. De fato, assim como anfetamina e antagonistas NMDA, cafeína e teofilina produzem hiperlocomoção em roedores, comportamento que é revertido por antipsicóticos (Ferre, 1997). Em humanos, altas doses de antagonistas adenosinérgicos podem produzir psicose (Hughes et al, 1998) e outros sintomas comumente observados na esquizofrenia (ansiedade, insônia), além de piorar a psicose e sintomas cognitivos observados em pacientes esquizofrênicos (Lucas et al, 1990; Hughes et al, 1998).

Os principais argumentos que sustentam este modelo de disfunção adenosinérgica na esquizofrenia estão sumarizados na tabela 1, onde as principais características da esquizofrenia e o papel fisiológico da adenosina são comparados. As xantinas cafeína e teofilina são os mais próximos modelos farmacológicos de hipofunção adenosinérgica em humanos, pelo fato de serem antagonistas não-seletivos de receptores A_1 e A_{2A} , e seus efeitos biológicos são atribuídos a esses mecanismos de ação (Fredholm et al, 1999). Em contraste com o intermitente e relativamente fraco bloqueio de receptores adenosinérgicos produzidos por baixas doses normalmente consumidas em

humanos, de acordo com este novo modelo, pacientes esquizofrênicos teriam uma diminuição persistente da atividade adenosinérgica, via receptores A_1 , afetando também a atividade dos receptores A_{2A} . Além disso, devido à baixa potência das xantinas em bloquear receptores de adenosina – baixa taxa micromolar comparada à moderada taxa nanomolar de adenosina (Dunwide e Masino, 2001; Fredholm et al, 1999) – doses moderadas de cafeína (~ 200 mg ou de 2 a 3 xícaras de café) ou teofilina (~400 mg) são, provavelmente, necessárias para exercerem um antagonismo suficiente da atividade adenosinérgica em humanos para começarem a funcionar como um modelo farmacológico de esquizofrenia.

A adenosina também tem mostrado influenciar respostas neurofisiológicas classicamente alteradas na esquizofrenia. O potencial evocado P50 e inibição pré-pulso (IPP) são medidas de filtro sensorial, as quais estão relacionadas com a capacidade de filtrar estímulos irrelevantes. Recentemente nosso grupo encontrou em voluntários saudáveis, sob o efeito do antagonista adenosinérgico teofilina, um prejuízo nesse filtro sensorial medido através do paradigma do P50, assemelhando-se muito com o que acontece na esquizofrenia (Ghisolfi et al, 2002). Em relação aos déficits neuropsicológicos, uma dose alta de cafeína piora o desempenho no teste Stroop em voluntários saudáveis (Foreman et al, 1989), que é outro achado observado na esquizofrenia.

A despeito de todos esses paralelismos entre esquizofrenia e ação de adenosina, são poucos os estudos sobre o sistema purinérgico na esquizofrenia. Um estudo pós-morte mostrou um aumento na densidade de receptores A_{2A} no *striatum* de pacientes esquizofrênicos (Kurumaji e Toru, 1998), sem diferenças entre pacientes medicados ou não. Ainda que eles tenham entendido esse resultado como uma regulação positiva (*up-regulation*) compensatória de receptores A_{2A} resultante de uma hiperfunção dopaminérgica, nosso grupo propõe uma explicação mais direta. Esse fato seria resultante da clássica regulação positiva compensatória devido à reduzida atividade adenosinérgica, a qual poderia produzir ou contribuir para um estado de hiperfunção dopaminérgica (Lara e Souza, 2000). E, finalmente, o gene do receptor A_{2A} é um candidato a suscetibilidade à esquizofrenia, na região 22q12-13 (Deckert et al, 1997).

Tabela 1

CARACTERÍSTICAS DA ESQUIZOFRENIA	PAPEL DA ADENOSINA OU EFEITOS DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES DE ADENOSINA (CAFEÍNA E TEOFILINA)
▪ <i>Aumento da atividade dopaminérgica</i> ¹	- Adenosina inibe a atividade dopaminérgica ²
▪ <i>Antagonistas NMDA geram sintomas semelhantes à esquizofrenia, talvez por aumentar a liberação de glutamato</i> ³	- Agonistas de adenosina revertem os efeitos de antagonistas NMDA ⁴ e inibem a liberação de glutamato ⁵
▪ <i>Curso deteriorante</i> ¹ , <i>neurodegeneração</i>	- Adenosina é neuroprotetora ⁵
▪ <i>Idade de início no fim da adolescência e início da idade adulta</i> ¹	- Efeitos sinápticos da adenosina ↑ com a idade, cafeína praticamente sem efeito em crianças ⁶
▪ <i>Componente de desenvolvimento neurológico e eventos perinatais como fatores de risco</i> ⁷	- Adenosina é o mediador de morte neuronal por hipóxia neonatal ⁸
▪ <i>Insônia global de esquizofrênicos e baixa atividade delta 1-2 Hz</i> ¹⁰	- Adenosina é um indutor do sono ⁵ e a cafeína gera insônia global e ↓ atividade delta 1-2 Hz ¹¹
▪ <i>Cafeína exacerba sintomas e o dipiridamol é terapêutico para esquizofrenia</i> ¹³	- Cafeína é antagonista de receptores A ₁ e A _{2A} e o dipiridamol inibe a recaptação de adenosina ⁵
▪ <i>Superioridade terapêutica da clozapina</i> ¹	- Clozapina atua via receptores de adenosina A _{2A} e aumenta a atividade ecto-5'-nucleotidásica ¹²
▪ <i>Déficit de filtração sensorial, falta de supressão no potencial evocado P50</i> ¹⁴	- A teofilina produz este déficit em controles saudáveis ¹⁵
▪ <i>Aumento de receptores A_{2A}</i>	- Regulação positiva (<i>up-regulation</i>) compensatória
▪ <i>Grande parte (~70%) dos esquizofrênicos fuma, geralmente 2 ou mais cartelas/dia</i> ¹	- Ratos tratados cronicamente com cafeína duplicam o consumo de nicotina ¹⁶

1. Lewis e Lieberman, 2000; Lara et al, 2001; 2. Ferre, 1997; 3. Tamminga, 1998. 4. Browne e Welch, 1982; Popoli et al, 1997; 5. Brundege e Dunwiddie, 1997; 6. Nehlig et al, 1992; Dumas e Foster, 1998; 7. Weinberger, 1995; 8. Turner et al, 2003; 10. Keshavan et al, 1998; 11. Landolt et al, 1995; 12. Pinna et al, 1999; Lara et al, 2001; 13. Lucas et al, 1990; Akhondzadeh et al, 2000; 14. Griffith et al, 1998; 15. Ghisolfi et al, 2002; 16. Shoaib et al, 1999.

3. CAFEÍNA COMO ANTAGONISTA ADENOSINÉRGICO

A cafeína, um antagonista não específico de receptores adenosinérgicos, é o psicoestimulante mais amplamente usado em todo o mundo. Seu consumo fica, em média, entre as doses de 200 a 500 mg/dia nos Estados Unidos e em países da Europa (Karcz-Kubicha et al, 2003). Sabe-se que seu consumo induz estimulação comportamental em roedores e humanos (Fredholm et al, 1999). Recentemente, mostrou-se que a cafeína induz aumento dos níveis de glutamato e de dopamina no *núcleo accumbens* (Solinas et al, 2002), assemelhando-se a algumas propriedades neuroquímicas de antagonistas NMDA (Adams e Moghadamm, 1998) e de outros psicoestimulantes em bloquear receptores A₁ de adenosina. Existe uma interação importante entre cafeína e a transmissão dopaminérgica, que é baseada no aumento da transmissão dos receptores D₂ pós-sinápticos e das aferências glutamatérgicas (Fredholm et al, 1999). Esse efeito é compartilhado por várias outras xantinas, e suas potências de ação estão correlacionadas com o bloqueio de receptores adenosinérgicos (Choi et al, 1988).

Acredita-se que o antagonismo adenosinérgico seja responsável pelos efeitos estimulatórios da cafeína (Fredholm, 1980), e que a administração prolongada de cafeína pode causar um pequeno aumento no número de receptores A₁ em diversas áreas do cérebro (Svenningsson et al, 1999). Após administração crônica, rapidamente é desenvolvida tolerância a esses efeitos estimulantes da cafeína e seu metabólito, a teofilina (Finn e Holtzman, 1987; Svenningsson et al. 1999).

Como previamente mostrado por Holtzman e Finn (1988), a exposição crônica à 1,0 mg/kg de cafeína na água de beber resulta numa aparente tolerância aos efeitos de ativação motora a doses agudas de cafeína de 10 mg/kg, mas essa tolerância não ocorre quando administrado anfetamina na dose de 1 mg/kg nos animais habituados, não havendo, portanto, tolerância cruzada a essa droga. Em acordo a esse estudo, a tolerância cruzada ocorre entre as xantinas, não ocorrendo entre não-xantinas de efeitos psicoestimulantes (Finn e Holtzman, 1987; Holtzman e Finn, 1988).

Existem estudos que indicam que os receptores A_{2A} são necessários para a ativação motora provocada pela cafeína (Ledent et al, 1997), mas o papel dos receptores A₁ não pode ser descartado.

De fato, Jacobson e co-autores (1993) encontraram evidências de sinergismo tanto nos efeitos deprimidos dos agonistas A_1 e A_{2A} quanto nos estimulantes dos antagonistas desses mesmos receptores. De maneira complementar a isso, outros achados sugerem que a tolerância aos efeitos estimulantes seja mediada, principalmente, pelos receptores A_1 , os quais teriam um papel modulatório da atividade A_{2A} . Conclui-se, então, que os efeitos de ativação motora produzidas por doses agudas de cafeína em ratos envolvam bloqueio central tanto de receptores A_1 quanto A_{2A} . Entretanto, durante a exposição crônica a cafeína na água de beber, o aparecimento de tolerância aos efeitos do bloqueio dos receptores A_1 parece ser o principal responsável pela tolerância aos efeitos de hiperativação motora provocada pela cafeína. Já os receptores A_{2A} estariam relacionados aos efeitos residuais dessa ativação motora (Karcz-Kubicha et al, 2003).

IV. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é relacionar os sistemas glutamatérgico – em especial os receptores NMDA – e o purinérgico – em particular a adenosina – em modelos de comportamento animais com relevância para a esquizofrenia, partindo da hipótese de hipofunção adenosinérgica.

Desse modo, foi testada a interação cafeína e MK-801, antagonistas dos receptores A_1/A_{2A} e NMDA, respectivamente, para se verificar a possibilidade de tolerância cruzada dos efeitos comportamentais do MK-801 em camundongos subcronicamente tratados com cafeína.

Em um artigo prévio que publicamos neste tópico (Dall’Igna et al, 2003 – vide anexo), mostramos que a dose de 1 mg/mL de cafeína na água por uma semana foi capaz de induzir tolerância cruzada à hiperlocomoção, mas não ao déficit cognitivo, medido pelo teste do labirinto em Y e pela esQUIVA inibitória, induzidos por MK-801 a 0,25 mg/Kg.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Nesta dissertação, ampliamos o estudo dessa interação através dos seguintes experimentos:

- a) Realização de curva de dose de cafeína subcrônica na água sobre os efeitos do MK-801 na locomoção;
- b) Realização de curva de tempo de exposição à cafeína subcrônica na água sobre os efeitos do MK-801 na locomoção;
- c) Verificação da ocorrência de tolerância cruzada entre cafeína subcrônica e MK-801 na menor dose capaz de provocar déficits cognitivos nas tarefas de alternância tardia e esQUIVA inibitória, de maneira complementar ao estudo prévio;
- d) Verificação da ocorrência de tolerância cruzada entre cafeína subcrônica e MK-801 quanto à ataxia causada por dose elevada de MK-801;

- e) Avaliação da possível reversibilidade dos efeitos cruzados da cafeína subcrônica sobre o MK-801, pelo aumento da dose desta última droga.



V. O MANUSCRITO DO ARTIGO

Artigo aceito em dezembro de 2004 na revista *Behaviour Pharmacology*.

Effect of subchronic caffeine treatment on MK-801-induced changes in locomotion, cognition and ataxia in mice

RICARDO V. DE OLIVEIRA¹, OSCAR P. DALL'IGNA¹, ADRIANO B. L. TORT¹, JULIANA F. SCHUH¹, PAULO FETT NETO¹, MÁRCIO W. SANTOS GOMES¹, DIOGO O. SOUZA¹, DIOGO R. LARA².

1. Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

2. Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

Corresponding Author:

Diogo R. Lara

Faculdade de Biociências, PUCRS

✉ Av. Ipiranga, 6681 Pd 12A

Porto Alegre, RS, Brazil

90619-900

E-mail: drlara@pucrs.br

Fax: +55 51 33203612

This study was supported by PRONEX (Grant # 41960904-366/96), CNPq and FAPERGS.

ABSTRACT

Rationale: NMDA receptor antagonists cause hyperlocomotion and cognitive deficits in rodents and caffeine-tolerant mice show diminished locomotor response to NMDA receptor antagonists.

Objectives: To evaluate MK-801 induced hyperlocomotion, ataxia and cognitive deficits after subchronic caffeine treatment in mice.

Methods: mice were treated subchronically with caffeine (0, 0.1, 0.3 and 1 mg/mL and 1, 3 and 7 days) and evaluated for locomotor activity, working memory (delayed alternation test), long-term memory (inhibitory avoidance task) and ataxia.

Results: hyperlocomotion induced by MK-801 (0.25 mg/kg i.p.) was diminished after 3 days and almost abolished after 7 days of caffeine treatment at 1 mg/mL dose, and this effect was also dose-dependent. Ataxia induced by 0.5 mg/kg MK-801 was not affected by caffeine treatment, but a short-lived hyperlocomotor effect was observed. Performance deficit in the inhibitory avoidance task induced by MK-801 (0.01 mg/kg) was prevented in mice treated with caffeine for 7 days at 1 mg/mL, and perseverative errors in the T-maze by MK-801 (0.4 mg/kg) were attenuated.

Conclusion: Hyperlocomotion and cognitive effects induced by MK-801 can be influenced by reduced adenosinergic activity. These findings agree with a model of adenosine hypofunction in schizophrenia, since NMDA receptor antagonists are pharmacological models for this disorder.

Keywords: Adenosine; MK-801; NMDA, caffeine; tolerance; schizophrenia; locomotion.

Abbreviation: A₁R, A₁ receptor; A_{2A}R, A_{2A} receptor.

INTRODUCTION

Caffeine, a non-selective adenosine receptor antagonist, increases locomotor activity apparently from an additive effect of A₁ (A₁R) and A_{2A} (A_{2A}R) receptors blockade, as reported by Karcz-Kubicha et al. (2003). According to Svenningsson et al. (1999), chronic caffeine treatment is well known to produce tolerance to its locomotor effect in animals, probably due to functionally relevant adaptations and alterations in gene expression in the hippocampus and striatum. As shown by Karcz-Kubicha et al. (2003), the acute motor-activating effects of 10 but not 30 mg/kg caffeine in rats undergo complete tolerance after chronic caffeine exposure (1 mg/mL in drinking water). This treatment also leads to complete cross-tolerance to specific A₁R antagonists, but not to A_{2A}R antagonists, which still produced significant motor activation. Thus, A₁R blockade might be mostly responsible for the tolerance to the motor-activating effects of caffeine, whereas a residual motor-activating effect of caffeine in tolerant animals seems to be mostly due to A_{2A}R blockade.

NMDA receptor antagonists, considered one of the best pharmacological models of schizophrenia, produce both hyperlocomotion and cognitive deficits in rodents, as reported by Angelucci et al. (1999), and Krystal et al. (1999). The activation of NMDA receptors increases adenosine release, as established by Hoehn and White (1989), Craig and White (1992 and 1993) and Manzoni et al. (1994), whereas adenosine agonists prevent neurophysiologic and behavioural actions of NMDA receptor antagonists, in accordance to Browne and Welch (1982), Popoli et al. (1997) and Fraser et al. (1997). In addition, both caffeine and NMDA receptor antagonists induce glutamate and dopamine release in the nucleus accumbens, as reported by Solinas et al. (2002) and Adams and Moghaddam (1998). In accordance with such common mechanisms, Dall'Igna et al. (2003) have recently shown that subchronic caffeine treatment (1 mg/mL for 7 days) causes cross-tolerance to the effect of NMDA receptor antagonist MK-801 on locomotion, but not for cognitive impairments as evaluated with the inhibitory avoidance task and spontaneous alternation. Importantly, in that study the dose of MK-801 in all behavioural tests was 0.25 mg/kg. In

accordance to Angelucci et al. (1999), this is a typical dose used for studies with locomotion, which is a behavioural parameter regarded as a model for psychotic symptoms in rodents. Finally, Sukhotina et al. (2004) showed that NMDA antagonists can inhibit the expression of caffeine withdrawal in mice.

The aim of this study is to further characterize the interaction of subchronic administration of caffeine with MK-801 in terms of drug doses, time of treatment and additional behavioural and cognitive tasks. To this end, the effects of different treatment regimens of caffeine and MK-801 were evaluated on locomotion, performance in inhibitory avoidance and delayed alternation tasks, as well as ataxia. Differently from our previous work, each task was conducted with the minimum dose of MK-801 that produced significant alteration in performance. We also tested the specificity of cross-tolerance to caffeine against the dopamine agonist amphetamine.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Experiments were performed with male adult albino mice (CF1) purchased from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS, when 21 days-old, and maintained in our own animal facilities under controlled environment ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 h light/dark cycle, free access to standard food and water) up to 3-4 months old (35-45 g), in groups of 8. All behavioural experiments were conducted between 10:00 a.m. and 6:00 p.m. (light phase) and were in accordance with the Guidelines for Animal Care of our university. Each animal was used only once in each task and drug tested.

Drugs

Caffeine, MK-801 and d-amphetamine sulfate were purchased from Sigma (St. Louis, MO) and were dissolved in fresh saline (0.9% NaCl) for acute administrations, which consisted of 10

mL/kg i.p. injections. Daily caffeine intake under subchronic treatment was calculated by measuring the caffeine concentration of total drinking solution divided by the number of animals in each cage and the number of days of treatment.

Subchronic treatment with caffeine

Mice were treated for 7 days with drug-free tap water or caffeine solution 0.1, 0.3 or 1.0 mg/mL as their only drinking solution, diluted in drinking water and their consumption was recorded. Other groups of mice were also treated with caffeine 1 mg/mL for 1, 3, and 7 days. For the delayed alternation task, mice received water or caffeine at the dose of 1.0 mg/mL for 10 days. Finally, for ataxia, mice received water or caffeine 1 mg/mL for 7 days. For all experiments, caffeine treatment was maintained until the test session to avoid withdrawal symptoms.

Locomotor activity recordings

Mice were randomly allocated to individual triangular boxes (50 cm X 30 cm X 30 cm, 50 cm high) with rounded corners, placed on the floor of a soundproof and diffusely illuminated room. Locomotor activity of eight mice was recorded simultaneously by a video-computerized system programmed by one of the authors (Adriano B. L. Tort), with image analysis at four frames per second. The software tracked the animals by distinguishing their white colour from the black background of the floor, registering X and Y horizontal coordinates. The method was set to examine horizontal locomotor activity, ignoring small movements, such as breathing, head and tail actions, and tremors. Animals had not been previously habituated to the boxes and were observed for a total of 4 h, with data divided in 10 min blocks. MK-801 (0.25 mg/kg and 0.5 mg/kg), amphetamine (5 mg/kg) or saline was administered i.p. to mice after one hour habituation to the boxes.

Ataxia

Ataxia was evaluated at 30 and 60 min after MK-801 (0.5 mg/kg) i.p. administration, which is a dose that produces clear ataxia, in comparison with 0.25 mg/kg, which produces no significant ataxia. Ataxia scores were adapted from Hönack and Löscher, 1995: 0 – no ataxia; 1– slight ataxia in hind-legs with tottering of the hind quarters; 2 – more pronounced ataxia with dragging of hind legs; 3 – further increase of ataxia and more pronounced dragging of hind legs; 4 – marked ataxia, animals lose balance during forward locomotion; 5 – very marked ataxia with frequent loss of balance during forward locomotion.

Inhibitory avoidance

Long-term memory was examined using the step-down type of inhibitory avoidance. The training apparatus is a 50 cm X 25 cm X 25 cm plastic box with a 2 cm high, 4 cm X 6 cm wide-platform at the centre of the training apparatus. The floor of the apparatus was made of parallel 0.1 cm calibre stainless steel bars spaced 1.0 cm apart. In the training session, the animal was placed on a platform and the latency to step down the four paws on the grid was measured; upon stepping down, mice received a 0.2 mA, 2 s scrambled foot shock. Test session step-down latency 24 h later was taken as measure of retention, to a ceiling time of 180 s. No foot shock was given in the test session. Preliminary dose finding studies (with 0.001, 0.003, 0.01, 0.03 and 0.01 mg/kg MK-801) showed that 0.01 mg/kg was the lowest dose of MK-801 to produce clear performance deficit (data not shown). MK-801 was administered i.p., 30 min before the training session.

Delayed alternation task

Delayed alternation performance was assessed in the T-maze protocol. The starting arm is 60 cm long, each side arm is 30 cm long, and both are 20 cm high and 10 cm wide. Mice were food deprived until they achieved 85% (\pm 5%) of their initial weight. Then, they were habituated in the T-maze for 4 days, receiving a cereal food reward (Kelloggs Sucrilhos) at the end of both side arms.

Each mouse was placed in the starting arm of the maze and allowed to explore it freely for 10 min, with the two open “goal” arms baited. After these adaptation sessions, mice were trained as follows. In the first trial, food reward was presented in both goal arms. During the next 15 trials, the arm opposite to the one the animal had just entered on the previous trial was baited, except when the animal had gone to the empty arm on the last trial. In this case, the food was left in the same place and the baited side was changed only after the animal had alternated. A sliding door was used to keep the animal into the arm for 20 seconds, and then the mouse was placed again in the starting arm for a 10 seconds inter-trial interval. This training procedure continued for 10 days, and only the animals that matched the criterion of 11 correct choices out of 15 trials on, at least, 3 consecutive days, were used in the experiment. All mice were trained for 10 days even if they had achieved the criteria before last 3 days of training, regardless of their performance in subsequent days, which was usually excellent. Seventy five percent of trained animals meet the criterion. They were then treated with water or caffeine (1mg/mL) in the drinking solution for 10 days. After this period, they were pre-tested and these scores were considered as “pre-test”; immediately afterwards they received 0.4 mg/kg MK-801 i.p. and, 30 min later, they were tested (“test” scores). This dose was the lowest dose to induce reliable performance deficit (comparing 0.1, 0.25, 0.4 and 0.5 mg/kg – data not shown).

Statistical Analysis

Comparisons between locomotor activities at different time points were analysed by a two-way ANOVA with repeated measures (drug treatment versus time) with time as the repeated measure. Duncan's Post hoc was used to determine differences among specific groups. Ataxia and step-down latency were analysed using Kruskal-Wallis followed by the Mann-Whitney U non-parametric test. The delayed alternation scores were analysed by Mann-Whitney test for between groups comparison and Wilcoxon test for within groups comparisons. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Caffeine intake

Mean daily doses of caffeine intake were 26 mg/kg/day, 70 mg/kg/day and 186 mg/kg/day for 0.1, 0.3 and 1.0 mg/mL groups, respectively. Mean daily fluid intake per animal for water, 0.1, 0.3 and 1.0 mg/mL groups were 7.8, 11, 9.8 and 7.8 mL, respectively.

Locomotion and ataxia:

When subchronically administered at doses of 0.1, 0.3 and 1 mg/mL, caffeine dose-time-dependently prevented MK-801 induced hyperlocomotion [$F(51,476) = 2.538$; $p < 0.05$] (figure 1A), with no effect at the dose of 0.1 mg/mL, intermediate effect at 0.3 mg/mL and a robust effect at the highest dose (between groups - $F(3,28) = 6.948$; $p < 0.001$). In terms of duration of treatment with caffeine (1 mg/mL), partial tolerance was observed after 3 days of caffeine treatment (figure 1B). Caffeine per se did not alter locomotion during the habituation period.

A higher acute dose of MK-801 (0.5 mg/kg) was tested to evaluate if this cross-tolerance induced by subchronic caffeine treatment was surmountable as well as to include ataxia as a behavioural parameter, which is not clearly observed at lower doses of MK-801. In the caffeine treated group (1 mg/mL for 7 days), MK-801 did increase locomotion, starting 20 min after the administration of the drug. However, this hyperlocomotion was short-lived compared to the water-control group ($p < 0.05$) (figure 2).

Cross tolerance was not observed when amphetamine (5 mg/kg) was administered (total locomotion for 90 min after amphetamine administration: $38,914 \pm 10,527$ counts in the 1 mg/mL caffeine group and $30,911 \pm 9,125$ counts in the water group; $n = 6$ mice per group; $p = 0.495$), in accordance with previous reports (Finn and Holtzman, 1987).

Regarding ataxia, no difference was found between groups at 30 (median caffeine = 3, control = 3; $Z = -0.546 - p = 0.585$) or 60 min (caffeine = 2, control = 1.5; $Z = 0 - p = 1$) (figure 3).

Figures 1A and 1B

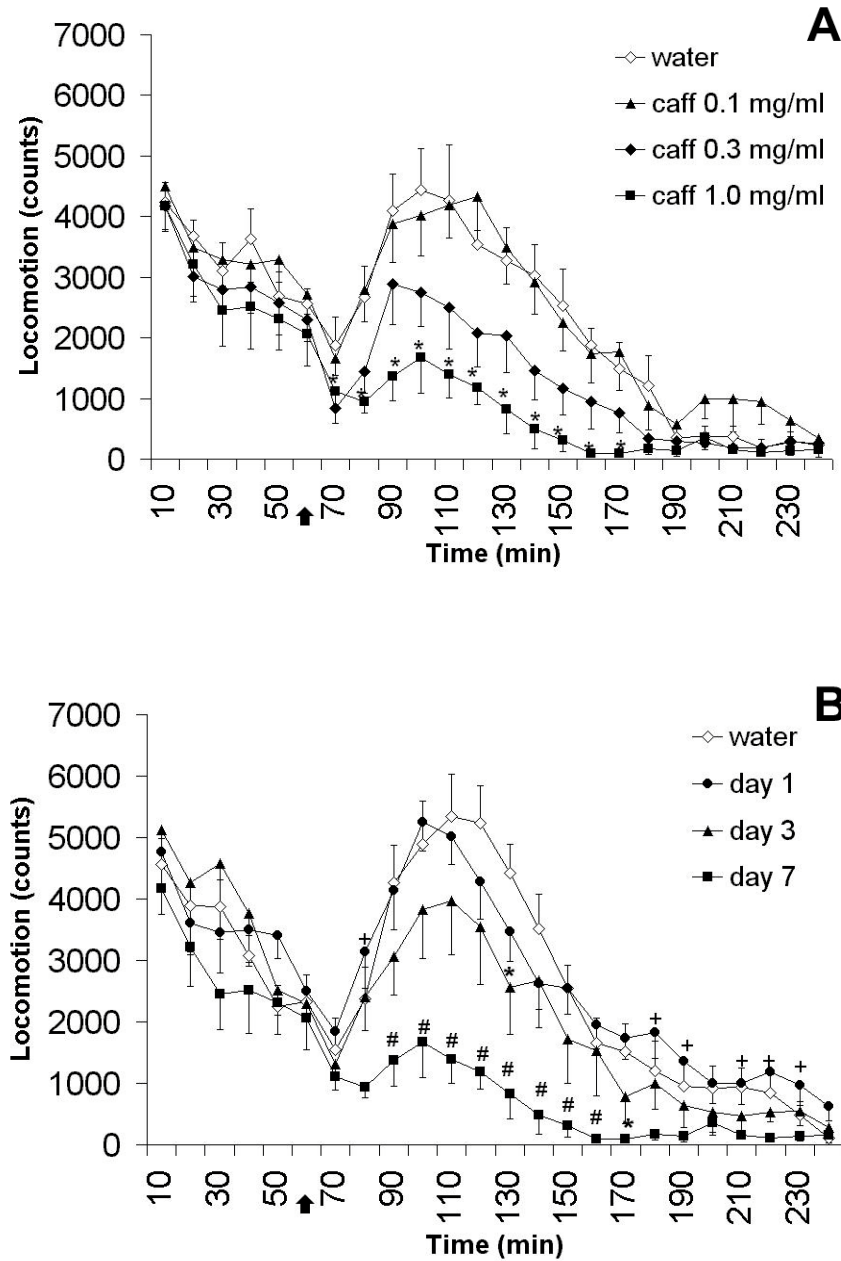


Fig. 1: Effect of caffeine on MK-801 induced hyperlocomotion. In figure 1A, mice were subchronically treated with caffeine on drinking water for 7 days at different doses (0.1, 0.3 and 1.0 mg/mL) and in 1B, mice were treated with 1.0 mg/mL caffeine for 1, 3 or 7 days. After 1-hour habituation, they received MK-801 (0.25 mg/kg, i.p.). ◊ Indicates MK-801 administration; * = $p < 0.05$ compared to the water control group; # = $p < 0.05$ compared to all groups; + = $p < 0.05$ compared to 7 days group (two-way ANOVA with repeated measures, post-hoc Duncan; $n = 8$).

Figure 2

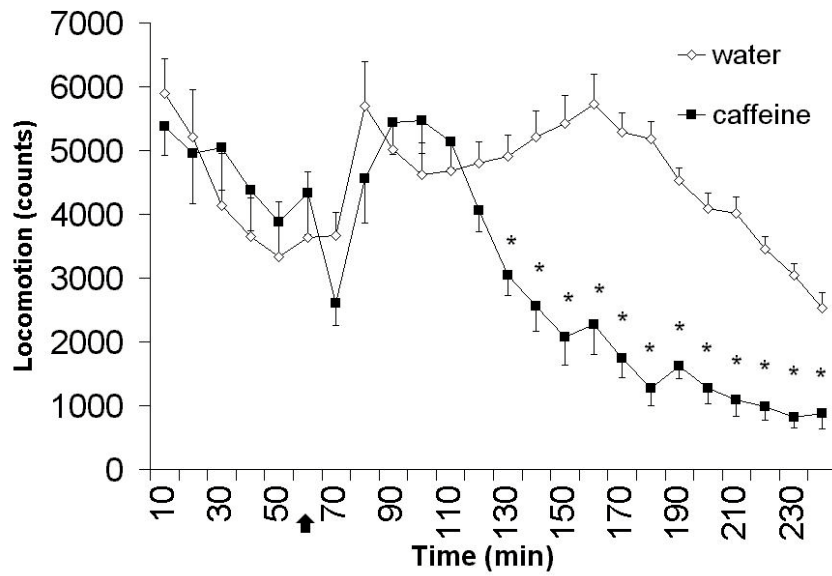


Fig. 2: Effect of caffeine on MK-801 induced hyperlocomotion. Mice were subchronically treated with caffeine on drinking water for 7 days (1.0 mg/mL). After 1-hour habituation, they received MK-801 (0.5 mg/kg, i.p.). \cap indicates MK-801 administration; * = $p < 0.05$ compared to the water control group (two-way ANOVA with repeated measures, post-hoc Duncan; $n = 8$).

Figure 3

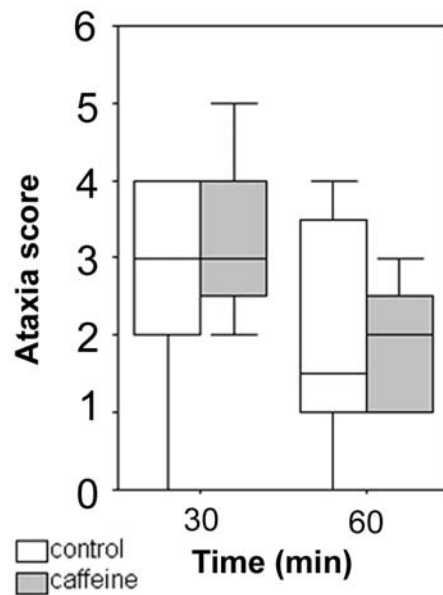


Fig. 3: Effect of caffeine on MK-801 on induced ataxia. Mice were subchronically treated with caffeine on drinking water for 7 days (1.0 mg/mL) and acutely with MK-801 (0.05 mg/kg, i.p.). Boxes indicate the median (\pm interquartile range) in the ataxia scores, adapted from Hönack and Löscher (1995) shifting from 0 (no ataxia) to 5 (very marked ataxia with frequent loss of balance during forward locomotion). Whiskers indicate 5 and 95 percentiles. $p > 0.05$ between groups on both evaluation times (30 and 60 min); (Mann-Whitney U and Wilcoxon tests; $n = 8$).

Cognition

In the inhibitory avoidance task, water and saline treated mice significantly increased step-down latency in the test session and caffeine *per se* did not alter the results, whereas MK-801 treatment significantly impaired memory in this task compared to water + saline group ($Z=4.402 - p<0.001$) (figure 4). In contrast, mice subchronically treated with 1 mg/mL caffeine had a similar score compared to caffeine + saline group ($Z = 1.076$; $p = 0.282$) and higher score compared to water+MK-801 group ($Z=2.061 - p=0.039$). Subchronic caffeine treatment with 0.1 and 0.3 mg/mL failed to prevent cognitive impairments.

In delayed alternation task, as shown in figure 5, both water and caffeine treated mice showed high performance on the pre-test session, which was conducted 10 days after the last day of

training. MK-801 (0.4 mg/kg, i.p.) significantly increased both total (water group $Z= 3.183 - p<0.001$; caffeine group $Z= 2.214 - p=0.027 -$ Wilcoxon test) and perseverative errors (water group $Z=3.119 - p<0.001$; caffeine group $Z=3.064 - p=0.002 -$ Wilcoxon test) in testing scores. However, caffeine treatment attenuated MK-801 induced perseverative errors ($Z=2.962 - p<0.002-$ Mann-Whitney test), but not total errors ($Z=1.681 - p=0.093$).

Figure 4

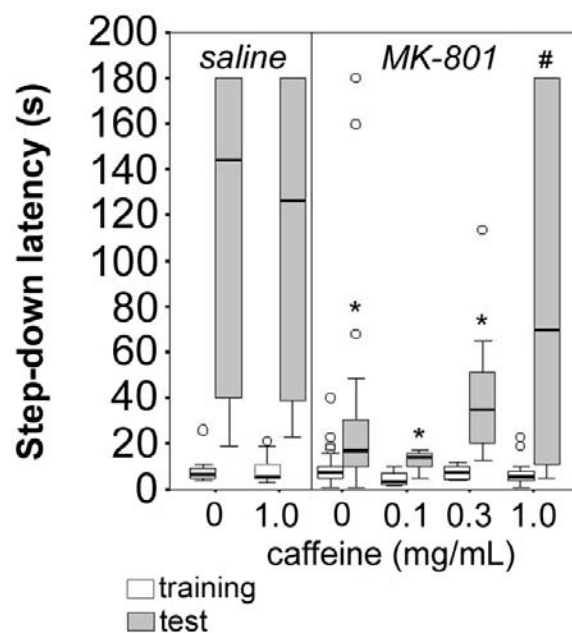


Fig. 4: Effect of caffeine on cognitive impairments induced by MK-801 (0.01 mg/kg, i.p.) in inhibitory avoidance test. Mice were subchronically treated with caffeine on drinking water for 7 days (0.1, 0.3 and 1.0 mg/mL). Boxes indicate the median (\pm interquartile range) latency to step-down from the platform. Animals received MK-801 30 min before the training session. * = $P < 0.05$ compared to the water control group; # = $p < 0.05$ compared to 0.1 and 0.3 mg/mL caffeine groups. ° indicates both extremes and outliers from the 5 to 95 percentile interval (Kruskal-Wallis followed by the Mann-Whitney U; $n = 19, 12, 29, 8, 7, 22$, respectively.)

Figure 5

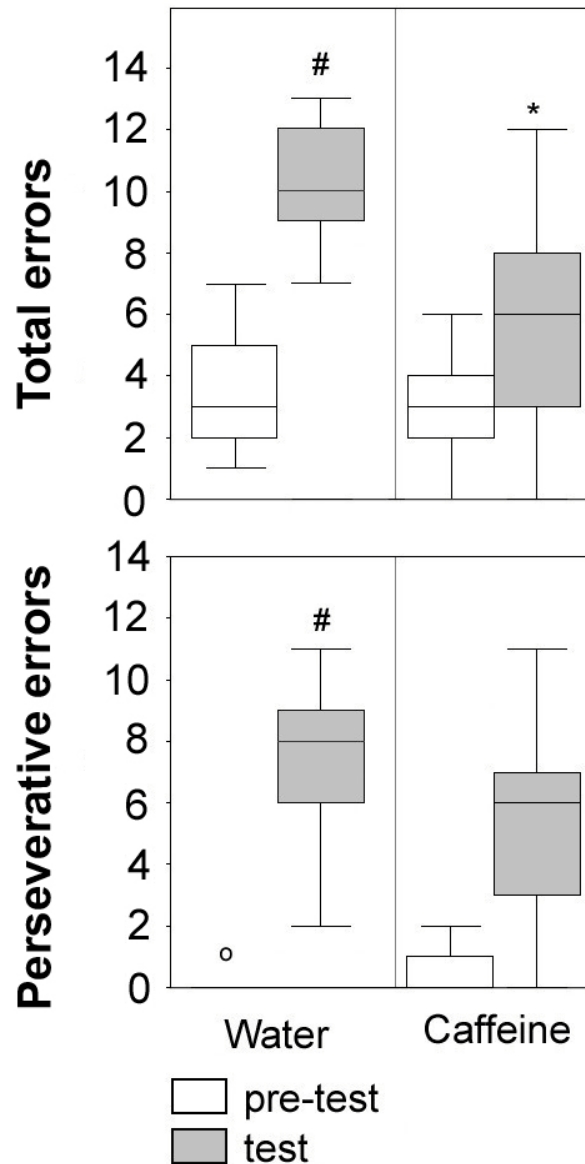


Fig. 5: Effect of caffeine on MK-801 cognitive impairments in the delayed alternation task. Mice were subchronically treated with caffeine on drinking water for 10 days (1.0 mg/kg). Boxes indicate the median (\pm interquartile range) total and perseverative error scores. Whiskers indicate 5 and 95 percentiles. Animals received MK-801 (0.4 mg/kg, i.p.) immediately after the pre-test session, which was 30 min before the testing session. * = $p < 0.05$ compared to total errors of the water control group # = $p < 0.05$ compared pre-test scores ° indicates outliers from the 5 to 95 percentile interval (Mann-Whitney U and Wilcoxon tests; $n = 8$).

DISCUSSION

In agreement with Dall'Igna et al. (2003), subchronic treatment with caffeine robustly reduced MK-801 induced hyperlocomotion. In this study, we observed that the full expression of this effect requires one week of treatment with 1 mg/mL of caffeine in the drinking solution. This dose-dependent pattern is similar to tolerance to acute administration of caffeine in mice chronically treated with caffeine, which is also partial with 0.3 mg/mL and full with 1 mg/mL, according to Svenningsson et al. (1999) and Karcz-Kubicha et al (2003). However, MK-801 hyperlocomotion could be elicited with the increment of dose to 0.5 mg/kg in caffeine treated mice, but this effect was transient compared to the control group, even though ataxia scores were not different between groups. Our previous study showed no effect of subchronic treatment with caffeine on inhibitory avoidance deficit induced by 0.25 mg/kg of MK-801, but with the lower dose of 0.01 mg/kg (the minimum dose to produce impairment in this task) used in the present study, the amnesic effect was fully prevented. We also evaluated this drug interaction in a model of working memory, which revealed a partial reversal in the number of total errors induced by MK-801 in the delayed alternation task. Therefore, the adjustment of MK-801 doses for cognitive impairments allowed the detection of cross-tolerance with caffeine, suggesting that this pharmacological interaction in both locomotor and cognitive effects may involve common pathways. This seems not to be true for the ataxic effect of MK-801, which indicates region-specific effects and in addition minimize the possibility that a pharmacokinetic interaction accounted for the observed cross-tolerance.

Chronic caffeine treatment seems to produce heterogeneous adaptations, depending on the endpoint studied. Holtzman and Finn (1988) observed two time patterns of tolerance to caffeine, being faster for locomotion (within 1-2 days) and longer for discriminative stimulus and operant response conditioning. It is also important to note that some of the acute effects of caffeine are in the opposite direction after long-term treatment with caffeine, as shown by Jacobson et al. (1996), in the case of seizures susceptibility, and this effect inversion was also observed by Fredholm et al. (1999) for an A₁R agonist. Since acute co-administration of caffeine and the NMDA receptor

antagonist ketamine produces an increment of locomotion compared to ketamine alone, the present results with caffeine may also be considered another case of effect inversion, as shown by Uchihashi et al. (1992).

Since caffeine blocks specifically A₁R and A_{2A}R at low doses, in accordance to Fredholm et al. (1999), the elevated dose of caffeine necessary to induce tolerance could involve other mechanisms (e.g., phosphodiesterase inhibition). However, it should be noted that cross-tolerance occurs also with selective adenosine receptor antagonists, making adenosine blockade the most probable mechanism. Karcz-Kubicha et al (2003) recently found that the participation of A₁R on locomotion undergoes full tolerance, whereas acute blockade of A_{2A}R remains able to induce hyperlocomotion after chronic treatment with caffeine. In this context, given the robust cross-tolerance with 0.25 mg/kg MK-801 and the relative surmountability of this effect with 0.5 mg/kg MK-801, it can be speculated that A₁R participation may account for most of the observed cross-tolerance. However, the contribution of A₁R and A_{2A}R should be directly investigated.

As reported by Manzoni et al. (1994), Delaney and Geiger (1998) and Melani et al. (1999), and Harvey and Lacey (1997), respectively, there is evidence that activation of NMDA receptors induces adenosine release in the hippocampus, striatum and *nucleus accumbens*. Also, NMDA receptor-mediated release of adenosine in the striatum seems also to be associated with the sedative action of low-dose NMDA in rats, which was counteracted by an A₁R antagonist, accordingly to Von Lubitz et al. (1993), as well as a non-selective adenosine receptor antagonist, but not by amphetamine, as shown by Gimenez-Llort et al. (1995). Thus, NMDA receptor activation results in adenosine release, which inhibits synaptic activity by activation of A₁R. Together with the present data, it can be suggested that an abrupt reduction of adenosine release may contribute to both locomotor and cognitive effects induced by NMDA receptor blockade. Further studies addressing this putative mechanism are warranted. Since NMDA receptor antagonists are considered a pharmacological model of schizophrenia, the interaction between adenosine and the glutamatergic system may have therapeutic implications.

REFERENCES

- Adams B, Moghaddam B (1998). Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. **J Neurosci** **14**:5545–5554.
- Angelucci ME, Vital MA, Cesario C, Zadusky CR, Rosalen PL, Da Cunha C (1999). The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **Eur J Pharmacol** **2–3**:135–140.
- Browne RG, Welch WM (1982) Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. **Science** **217**:1157–1159.
- Craig CG, White TD (1992). Low-level N-methyl-D-aspartate receptor activation provides a purinergic inhibitory threshold against further N-methyl-D-aspartate-mediated neurotransmission in the cortex. **J Pharmacol Exp Ther** **3**:1278–1284.
- Craig CG, White TD (1993). N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. **J Neurochem** **60**:1073–1080.
- Cunha RA (2001). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem Int** **38**:107–125.
- Dall'Igna OP, Da Silva AL, Dietrich MO, Hoffmann A, de Oliveira RV, Souza DO, Lara DR (2003). Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice. **Psychopharmacology (Berl)** **166**:258–263.
- Delaney SM, Geiger JD (1998). Levels of endogenous adenosine in rat striatum. II. Regulation of basal and N-methyl-D-aspartate-induced levels by inhibitors of adenosine transport and metabolism. **J Pharmacol Exp Ther** **285**:568–572.
- Finn IB, Holtzman SG (1987). Pharmacologic specificity of tolerance to caffeine-induced stimulation of locomotor activity. **Psychopharmacology (Berl)** **93**:428–434.

- Fraser CM, Fisher A, Cooke MJ, Thompson ID, Stone TW (1997). Purine modulation of dizocilpine effects on spontaneous alternation. **Psychopharmacology (Berl)** **130**:334–342.
- Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol Rev** **51**:83–133.
- Gimenez-Llort L, Martinez E, Ferre S (1995). Dopamine-independent and adenosine-dependent mechanisms involved in the effects of N-methyl-D-aspartate on motor activity in mice. **Eur J Pharmacol** **275**:171–177.
- Harvey J, Lacey MG (1997). A postsynaptic interaction between dopamine D₁ and NMDA receptors promotes presynaptic inhibition in the rat nucleus accumbens via adenosine release. **J Neurosci** **14**: 5271–5280.
- Hoehn K, White TD (1989). Evoked release of endogenous adenosine from rat cortical slices by K⁺ and glutamate. **Brain Res** **478**: 149–151.
- Holtzman SG, Finn IB (1988). Tolerance to behavioral effects of caffeine in rats. **Pharmacol Biochem Behav** **29**:411–418.
- Hönack D, Löscher W (1995). Kindling increases the sensitivity of rats to adverse effects of certain antiepileptic drugs. **Epilepsia** **36**: 763–771.
- Jacobson KA, von Lubitz DK, Daly JW, Fredholm BB (1996). Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment. **Trends Pharmacol Sci** **17**:108–113.
- Karcz-Kubicha M, Antoniou K, Terasmaa A, Quarta D, Solinas M, Justinova Z, Pezzola A, Reggio R, Muller CE, Fuxe K, Goldberg SR, Popoli P, Ferre S (2003). Involvement of adenosine A₁ and A_{2A} receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. **Neuropsychopharmacology** **28**: 1281–1291.
- Krystal JH, D'Souza DC, Karper LP, Bennett A, Abi-Dargham A, Abi-Saab D, Cassello K, Bowers MB, Jr., Vegso S, Heninger GR, Charney DS (1999) Interactive effects of subanesthetic ketamine and haloperidol in healthy humans. **Psychopharmacology (Berl)** **145**:193–204.

- Lara DR (2002). Inhibitory deficit in schizophrenia is not necessarily a GABAergic deficit. **Cell Mol Neurobiol** **22**:239–247.
- Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA (1994). Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. **Science** **265**: 2098–2101.
- Melani A, Corsi C, Gimenez-Llort L, Martinez E, Ogren SO, Pedata F, Ferre S (1999). Effect of N-methyl-D-aspartate on motor activity and in vivo adenosine striatal outflow in the rat. **Eur J Pharmacol** **385**:15–19.
- Popoli P, Reggio R, Pezzola A (1997). Adenosine A₁ and A₂ receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. **Eur J Pharmacol** **333**: 143–146
- Solinas M, Ferre S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR (2002). Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. **J Neurosci** **22**:6321–6234.
- Sukhotina IA, Zvartau EE, Danysz W, Bessalov AY (2004). Caffeine withdrawal syndrome in social interaction test in mice: effects of the NMDA receptor channel blockers, memantine and neramexane. **Behav Pharmacol** **15**:207-14.
- Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB (1999). The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. **J Neurosci** **19**:4011–4022.
- Uchihashi Y, Kuribara H, Tadokoro S (1992). Assessment of the ambulation-increasing effect of ketamine by coadministration with central-acting drugs in mice. **Jpn J Pharmacol** **60**:25–31.
- Von Lubitz DK, Paul IA, Carter M, Jacobson KA (1993). Effects of N6-cyclopentyl adenosine and 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine on N-methyl-D-aspartate induced seizures in mice. **Eur J Pharmacol** **249**:265–270.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo o desbalanço neuroquímico hipotetizado por Kegeles et al (2000), haveria vias glutamatérgicas de retroalimentação que partiriam do córtex pré-frontal (CPF) até a substância negra (SN) e a área tegmental ventral (ATV) do mesencéfalo. O mecanismo pelo qual as drogas antagonistas de receptores NMDA mimetizariam a esquizofrenia seria pelo bloqueio da atividade dos interneurônios inibitórios GABAérgicos, que expressam abundantemente esse tipo de receptores. Desse modo, as vias excitatórias, que contam com receptores AMPA e K_a além do NMDA, estariam apenas parcialmente inibidas, causando uma hiperativação das vias dopaminérgicas que se projetam ao *striatum* (figura 2).

Adicionalmente, estudos prévios mostraram que a maior densidade de receptores A_{2A} de adenosina se encontra no *striatum* (Svenningsson et al, 1999). Esse receptor está intimamente relacionado com os receptores D_2 de dopamina (Rimondini et al, 1997), tendo um importante papel na neuromodulação da dopamina (Ferre et al, 1991): ambos receptores encontram-se co-localizados em neurônios GABAérgicos do *striatum*, formando complexos funcionais de ações opostas (Ferre, 1997; Hillion et al, 2002), visto que a ocupação dos receptores A_{2A} diminui a afinidade dos receptores D_2 pela dopamina. Já os receptores A_1 são amplamente distribuídos e modulam a liberação de vários neurotransmissores, como a dopamina e o glutamato. Assim, segundo a hipótese de hipofunção adenosinérgica, além dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral estarem menos inibidos via receptores A_1 , no *striatum*, a afinidade pela dopamina estaria aumentada, também pela baixa no tônus adenosinérgico, via receptores A_{2A} .

Por fim, uma das perspectivas de continuação desse estudo seria usar antagonistas seletivos de adenosina, tanto de A_1 quanto de A_{2A} , ao invés de não específicos como a cafeína. Entender a ação da adenosina faz-se relevante para a compreensão da neurobiologia da esquizofrenia. Seu papel neuromodulador está fortemente relacionado com as duas principais vias neuroquímicas que

visam explicar essa patologia, que são as vias dopaminérgicas e glutamatérgicas. Assim, a modulação desses sistemas através da adenosina pode ser uma estratégia eficaz para o desenvolvimento de fármacos que visem a melhorar os sintomas da esquizofrenia.

Figura 2

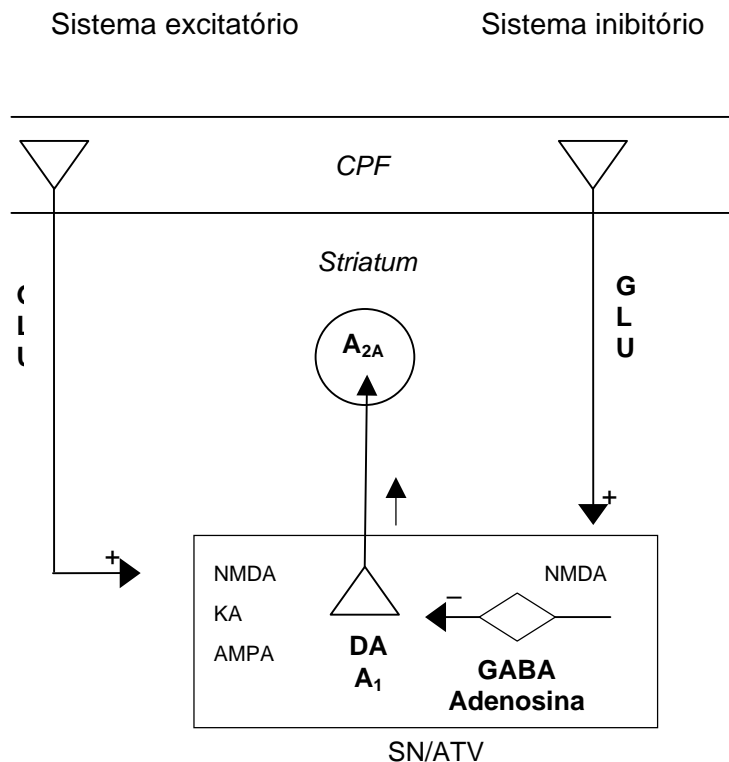


Fig. 2: As vias glutamatérgicas, reguladas pelo córtex pré-frontal (CPF), seriam as principais responsáveis pelo sistema de retro-alimentação para regulação da atividade do *striatum*. Essas vias se projetam até a substância negra (SN) e área tegmental ventral (ATV), do mesencéfalo. Os antagonistas NMDA agiriam por cortar a ativação em interneurônios inibitórios, que são ativados por receptores NMDA. Entretanto, o sistema excitatório continuaria sendo ativado via receptores AMPA e Ka. Isso resultaria na hiperativação das vias dopaminérgicas que se projetam para o *striatum*, onde há a maior densidade de receptores adenosinérgicos do subtipo A_{2A}. Com a diminuição do tônus adenosinérgico, a dopamina terá uma ocupação maior nos receptores D₂ pelo aumento da afinidade aos receptores e haverá menor inibição glutamatérgica via adenosina pelos receptores A₁. Adaptado de Kegeles et al (2000).

VII. CONCLUSÕES

A partir da hipótese de um desbalanço neuromodulatório envolvendo a adenosina, constatamos que o tratamento subcrônico com cafeína claramente reduz a hiperlocomoção e minimiza os déficits cognitivos provocados por MK-801.

Neste estudo, observamos que a expressão completa desse efeito leva uma semana para desenvolver-se, na dose de 1 mg/mL de cafeína diluída em água. Esse mesmo padrão de dose-dependência é encontrado na tolerância aos efeitos da administração aguda de cafeína após sua administração crônica, ou seja, é parcial na dose de 0,3 mg/mL e completa na dose de 1 mg/mL, resultados em acordo com Svenningsson et al. (1999) e Karcz-Kubicha et al. (2003). A hiperlocomoção provocada por MK-801 pode ser parcialmente eliciada com o aumento da dose para 0,5 mg/kg nos camundongos tratados com cafeína e não houve diferenças quanto aos escores na ataxia.

Em nosso estudo prévio, a dose de 0,25mg/kg de MK-801 mostrou-se amnésica mesmo nos animais tratados com cafeína. Entretanto, quando se usou a menor dose capaz de provocar déficits cognitivos em camundongos (0,01 mg/kg), seu efeito amnésico foi totalmente prevenido nos animais tratados com cafeína.

Esses resultados sugerem um importante envolvimento da adenosina nas alterações locomotoras causadas por MK-801, corroborando a hipótese de que o efeito estimulante do antagonismo de receptores NMDA é, no mínimo, parcialmente mediado por um estado de hipofunção adenosinérgica. Visto que a ativação dos receptores NMDA resulta na liberação de adenosina, a qual inibe a ativação sináptica por ativação de receptores A₁, juntamente com estes dados, pode ser sugerido que uma redução abrupta da liberação de adenosina pode contribuir tanto para os efeitos na locomoção quanto para os efeitos cognitivos induzidos pelo bloqueio de receptores NMDA. E, partindo-se do princípio que antagonistas NMDA são modelos farmacológicos de esquizofrenia, a interação entre adenosina e o sistema glutamatérgico pode abrir

perspectivas no entendimento da sua patofisiologia, assim como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, Weiss R, Cooper TB, Mann JJ, Van Heertum RL, Gorman JM, Laruelle M. (2000). Increased baseline occupancy of D₂ receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci* **97**:8104-8109.

Adams B, Moghaddam B. (1998). Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *J Neurosci* **18**:5545-5554.

Akhondzadeh S, Shasavand E, Jamilian H, Shabestari O, Kamalipour A. (2000). Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interactions. *J Clin Pharm Ther* **25**:131-137.

Bibbiani F, Oh JD, Petzer JP, Castagnoli NJr, Chen JF, Schwarzschild MA, Chase TN. (2003). A_{2A} antagonist prevents dopamine agonist-induced motor complications in animal models of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **184**:285-294.

Browne RG, Welch WM. (1982). Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science* **217**:1157-1159.

Brundege JM, Dunwiddie TV. (1997). Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol* **39**:353-391.

Carlsson A. (1974). Antipsychotic drugs and catecholamine synapses. *J Psychiatr Res* **11**:57-64.

Craig CG, White TD. (1993). N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. *J Neurochem* **60**:1073-1080.

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

Choi OH, Shamim MT, Padgett WL and Daly JW. (1988). Caffeine and theophylline analogues: Correlation of behavioral effects with activity as adenosine receptor antagonists and as phosphodiesterase inhibitors. *Life Sci* **43**:387-398.

Dall'Igna OP, Da Silva AL, Dietrich MO, Hoffmann A, de Oliveira RV, Souza DO, Lara DR. (2003). Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **166**:258-263.

Deckert J, Nothen MM, Bryant SP, Schuffenhauer S, Schofield PR, Spurr NK, Propping P. (1997). Mapping of the human adenosine A_{2A} receptor gene: relationship to potential schizophrenia loci on chromosome 22q and exclusion from the CATCH 22 region. *Hum Genet* **99**:326-328.

DSM-IV – *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*. (1995). 4ª edição. Porto Alegre: Artes Médicas. 263-302.

Dumas TC, Foster TC. (1998). Late developmental changes in the ability of adenosine A₁ receptors to regulate synaptic transmission in the hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* **105**:137-139.

Dunwiddie TV, Masino SA. (2001). The role and the regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **24**:31-55.

Ferre S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K. (1991). Stimulation of high-affinity adenosine A₂ receptors decreases the affinity of dopamine D₂ receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci* **88**:7238-7241.

Ferre S. (1997). Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum: Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* **133**:107-120.

Finn IB, Holtzman SG. (1987). Pharmacologic specificity of tolerance to caffeine-induced stimulation of locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl)* **93**:428-434.

Foreman N, Barraclough S, Moore C, Mehta A, Madon M. (1989). High doses of caffeine impair performance of a numerical version of the Stroop task in men. *Pharmacol Biochem Behav* **32**:399-403.

Fredholm BB, Batting K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* **51**:83-133.

Fredholm BB. (1980). Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine? *Trends Pharmacol Sci* **1**:129-132.

Ghisolfi ES, Prokopiuk AS, Becker J, Ehlers JA, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO, Lara DR. (2002). The adenosine antagonist theophylline impairs p50 auditory sensory gating in normal subjects. *Neuropsychopharmacology* **27**:629-637.

Gimenez-Llort L, Martinez E, Ferre S. (1995). Dopamine-independent and adenosine-dependent mechanisms involved in the effects of N-methyl-D-aspartate on motor activity in mice. *Eur J Pharmacol* **275**:171-177.

Griffith JM, O'Neill JE, Petty F, Garver D, Young D, Freedman R. (1998). Nicotinic receptor desensitization and sensory gating deficits in schizophrenia. *Biol Psychiatry* **44**:98-106.

Heresco-Levy U, Ermilov M, Shimoni J, Shapira B, Silipo G, Javitt DC. (2002). Placebo-controlled trial of D-cycloserine added to conventional neuroleptics, olanzapine, or risperidone in schizophrenia. *Am J Psychiatry* **159**:480-482.

Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Mordel C, Silipo G, Lichtenstein M. (1999). Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* **56**:29-36.

Hillion JA, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferre S, Fuxe K. (2002). Coaggregation, cointernalization and codesensitization of adenosine A_{2A} receptors and dopamine D₂ receptors. *J Biol Chem* **277**:18091-18097.

Hoehn K, Craig CG, White TD. (1990). A comparison of N-methyl-D-aspartate-evoked release of adenosine and [3H]norepinephrine from rat cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther* **255**:174-181.

Hoehn K, White TD. (1990). Glutamate-evoked release of endogenous adenosine from rat cortical synaptosomes is mediated by glutamate uptake and not by receptors. *J Neurochem* **54**:1716-1724.

Holtzman SG, Finn IB. (1988). Tolerance to behavioral effects of caffeine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **29**: 411-418.

Hughes JR, McHugh P, Holtzman S. (1998). Caffeine and schizophrenia. *Psychiatric Serv* **49**:1415-1417.

Jacobson KA, Nikodijevic O, Padgett WL, Gallo-Rodriguez C, Maillard M, Daly JW. (1993). 8-(3-Chlorostyryl)-caffeine (CSC) is a selective A₂-adenosine antagonist in vitro and in vivo. *FEBS Lett* **323**: 141-144.

Kandel, ER, Schwartz JH, Jessell TM. (2000). *Principles of Neural Science*. 4^a Edição. Nova Iorque: McGraw-Hill. 1188-1208.

Karcz-Kubicha M, Antoniou K, Terasmaa A, Quarta D, Solinas M, Justinova Z, Pezzola A, Reggio R, Müller CE, Fuxe K, Goldberg SR, Popoli P, Ferre S. (2003). Involvement of adenosine A₁ and A_{2A} receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. *Neuropsychopharmacology* **28**:1281-1291.

Kegeles, LS, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Rodenhiser-Hill J, Mann JJ, Van Heertum RL, Cooper, TB, Carlsson A, Laruelle M. (2000). Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry* **48**:627-640.

Keshavan MS, Reynolds CF 3rd, Miewald MJ, Montrose DM, Sweeney JA, Vasko RC Jr, Kupfer DJ. (1998). Delta sleep deficits in schizophrenia: evidence from automated analyses of sleep data. *Arch Gen Psychiatry* **55**:443-448.

Kurumaji A, Toru M. (1998). An increase in [3H] CGS21680 binding in the striatum of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Brain Res* **808**: 320-323.

Landolt HP, Dijk DJ, Gaus SE, Borbely AA. (1995). Caffeine reduces low frequency delta activity in the human sleep EEG. *Neuropsychopharmacology* **12**:229-238.

Lara DR, Souza DO. (2000). Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Med Hypotheses* **54**:157-166.

Lara DR, Vianna MR, de Paris F, Quevedo J, Osés JP, Battastini AM, Sarkis JJ, Souza DO. (2001). Chronic treatment with clozapine, but not haloperidol, increases striatal ecto-5'-nucleotidase activity in rats. *Neuropsychobiology* **44**:99-102.

Laruelle M. (1998). Imaging dopamine transmission in schizophrenia. A review and meta-analysis. *Q J Nucl Med* **42**:211-221.

Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* **388**:674-678.

Lewis DA, Lieberman JA. (2000). Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* **28**:325-334.

Lipton SA, Rosenberg PA. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* **330**:613-622.

Lucas PB, Pickar D, Kelsoe J, Rapaport M, Pato C, Hommer D. (1990). Effects of the acute administration of caffeine in patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry* **28**:35-40.

Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA. (1994) Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* **265**:2098-2101.

Neary JT. (1996). Trophic actions of extracellular ATP on astrocytes, synergistic interactions with fibroblast growth factors and underlying signal transduction mechanisms. *Ciba Found Symp* **198**:130-141.

Nehlig A, Daval JL, Debry G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev* **17**:139-170.

Olney JW, Newcomer JW, Farber NB. (1999). NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* **33**:523-533.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **54**:581-618.

Pin JP, Duvoisin R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* **34**:1-26.

Pinna A, Wardas J, Cozzolino A, Morelli M. (1999). Involvement of adenosine A_{2A} receptors in the induction of c-fos expression by clozapine and haloperidol. *Neuropsychopharmacology* **20**:44-51.

Popoli P, Reggio R, Pezzola A: (1997). Adenosine A₁ and A₂ receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. *Eur J Pharmacol* **333**:143-146.

Pycock CJ, Kervin RW, Carter CJ. (1980). Effect of lesion of cortical dopamine terminals on subcortical dopamine receptors in rats. *Nature* **286**:74-77.

Ralevic V, Burnstock G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**:413-492.

Rimondini R, Ferre S, Ogren SO, Fuxe K. (1997). Adenosine A_{2A} agonists: a potential new type of atypical antipsychotic. *Neuropsychopharmacology* **17**:82-91

Rivkees SA, Price SL, Zhou FC. (1995). Immunohistochemical detection of A₁ adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Research* **677**:193-203.

Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K. (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* **45**:250-565.

Shoaib M, Swanner LS, Yasar S, Goldberg SR. (1999). Chronic caffeine exposure potentiates nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **142**:327-333.

Solinas M, Ferre S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR. (2002). Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci* **22**: 6321-6324.

Stahl, Stephn M. (2002). *Psicofarmacologia – Base Neurocientífica e Aplicações Práticas*; 2ª edição. Rio de Janeiro: Medsi 357-390.

Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB. (1999). Distribution, Biochemistry and Function of Striatal Adenosine A_{2A} Receptors. *Progress in Neurobiology* **59**:355-396.

Tamminga CA. (1998). Schizophrenia and glutamatergic transmission. *Crit Rev Neurobiol* **12**:21-36.

Turner CP, Seli M, Ment L, Stewart W, Yan H, Johansson B, Fredholm BB, Blackburn M, Rivkees SA. (2003). A₁ adenosine receptors mediate hypoxia-induced ventriculomegaly. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:11718-11722.

Weinberger DR. (1987). Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* **44**:660-669.

Weinberger DR. (1995). From neuropathology to neurodevelopment. *Lancet* **346**:552-557.

Zimmermann H. (1996). Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* **49**: 589-618.

VIII. ANEXO

Artigo publicado na revista *Psychopharmacology*.

