

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

Natália Pagnussat

**O envolvimento dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} na
memória em camundongos machos adultos**

PORTO ALEGRE, 2015.

Natália Pagnussat

**O envolvimento dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} na
memória em camundongos machos adultos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas -
Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas –
Bioquímica.

Orientadora: Professora Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula

PORTO ALEGRE, 2015.

*“Viva como se fosse morrer amanhã, aprenda como se fosse viver
para sempre.”*

(Gandhî).

Para o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas, amigos, companheiros de grupo e de muitos experimentos, em especial as minhas queridas Giovanna, Amanda, Dani G., Dani M., Dani P., Bina e Fezinha, que me acompanharam mais de perto neste período, compartilhando comigo os mais variados momentos. Obrigada por tudo gurias.

Aos demais colegas e professores dos laboratórios 24, 26 e 28 por todos esses anos de convivência e aprendizado.

Aos colegas Paulo e Cássio e demais autores deste trabalho, por toda a ajuda e empenho.

Ao professor Rodrigo Cunha por todos os ensinamentos e contribuições impecáveis para a realização deste artigo.

À minha amigona do coração Fezinha, muito obrigada por tudo. Faltam palavras pra te agradecer, por me aturar, me ajudar, me cuidar e principalmente por me fazer acreditar que tudo iria dar certo no final, com certeza a tua amizade foi um dos melhores presentes que a Bioquímica me trouxe.

À minha querida e grande amiga Vanessa, que foi a responsável pela minha iniciação no laboratório de Bioquímica, por todo o aprendizado, paciência, amizade e carinho de sempre.

Ao meu grande mestre Diogo Lara, por ter me dado inúmeras oportunidades ao longo de todos estes anos de convivência e por sempre me incentivar, torcer e vibrar comigo todas as minhas conquistas. Serei eternamente grata a ti, Diogo.

Aos meus amigos de fora do meio acadêmico, que de alguma forma sempre estiveram presentes, me apoiando e me incentivando em todos os momentos.

Aos meus familiares por estarem sempre presentes na minha vida, me incentivando e me ajudando, sem vocês nada disso teria sentido. Especialmente agradeço a minha mãe Lígia e a minha avó Ernestina, por serem meus exemplos de força, coragem, determinação e amor incondicional.

Ao meu marido Augusto, a quem eu dedico esta tese, por estar sempre ao meu lado, me confortando, incentivando e auxiliando em todos os momentos, obrigada por todo o carinho, amor e paciência.

Aos membros da banca, pela leitura e exame do presente trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

E por fim, agradeço a minha querida orientadora, a professora Lisiane por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pela oportunidade, paciência, conselhos, dedicação e por todos os ensinamentos ao longo dos últimos quatro anos. Obrigada por tudo, Lisi.

APRESENTAÇÃO

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

A parte I contém o resumo, a introdução e os objetivos do trabalho.

A parte II aborda essencialmente os materiais e métodos e os resultados do trabalho, sendo apresentada na forma de artigo científico.

A parte III constitui-se da interpretação dos resultados (discussão), conclusões, perspectivas e referências.

As sessões de introdução, discussão e conclusão encontradas nesta tese apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados presentes no artigo científico. As referências bibliográficas adicionais ao final desta tese representam as utilizadas apenas nas partes I e III.

Os trabalhos realizados nesta tese foram desenvolvidos no Departamento de Bioquímica da UFRGS, no laboratório 26, sob a orientação da Professora Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula.

SUMÁRIO

PARTE I.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
I. INTRODUÇÃO.....	7
I.1 Memória.....	7
I.2 Protocolos experimentais de memória.....	10
I.3 Adenosina.....	15
I.4 Cafeína e memória.....	18
I.5 Receptores de adenosina e memória.....	22
I.6 Sistema colinérgico, adenosina e memória.....	25
II. OBJETIVOS.....	31
II.1 Objetivo geral.....	31
II.2 Objetivos específicos.....	31
PARTE II.....	32
Capítulo I - Adenosine A_{2A} receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice.....	33
PARTE III.....	49
III. Discussão.....	50
IV. Conclusão.....	58
V. Perspectivas.....	59
VI. Referências bibliográficas.....	60

PARTE I

RESUMO

A cafeína é o psicoestimulante mais consumido mundialmente. Sua ação farmacológica consiste em bloquear os receptores de adenosina A_1 e A_{2A} . A administração crônica de cafeína previne déficits cognitivos decorrentes da idade e em modelos experimentais da doença de Alzheimer. Esses efeitos preventivos são também observados pela administração do antagonista seletivo do receptor de adenosina A_{2A} . Nesse trabalho investigou-se a participação dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} na prevenção dos déficits cognitivos induzidos por escopolamina. Também foi investigado se a manipulação dos receptores A_{2A} teria algum impacto na memória em camundongos *naive*. Para isso, foram utilizadas três tarefas comportamentais que avaliaram três tipos de memória: a tarefa de reconhecimento de objetos (RO), a esQUIVA inibitória (EI) e o labirinto em Y. A administração intraperitoneal de escopolamina (1,0 mg/kg) prejudicou o desempenho da memória de curto prazo nas três tarefas utilizadas. O antagonista de receptores A_1 (DPCPX, 1,0 mg / kg, i.p.) preveniu a amnésia induzida por escopolamina no RO e na EI, enquanto o antagonista de receptores A_{2A} (SCH 58261, 0,5 mg / kg, i.p.) preveniu a amnésia em todos os testes. Além disso, ambos os antagonistas não apresentaram efeitos sobre a memória ou a locomoção em animais *naive*. Também foi observado que a ativação dos receptores A_{2A} , a partir da administração de CGS 21680 (0,1 mg/kg, i.p.) antes da sessão de treino, foi suficiente para provocar prejuízos na memória em animais *naive* também nas três tarefas, e este efeito foi prevenido por meio da administração de SCH 58261 (0,5 mg/kg, i.p.). Por fim, a administração intracerebroventricular (i.c.v) de CGS 21680 (50 nmol) também prejudicou o desempenho dos animais na

tarefa de RO. Em conjunto, estes resultados sugerem que a ativação dos receptores A_{2A} é suficiente para provocar déficits de memória e ainda sugerem que os receptores A_1 também participam de maneira seletiva no controle dos déficits de memória relacionados ao sistema colinérgico.

ABSTRACT

Caffeine, a non-selective adenosine receptor antagonist, prevents memory deficits, an effect mimicked by adenosine A_{2A} receptor (A2AR), but not receptor A_1 (A1R), antagonists upon aging and Alzheimer's disease. We tested if A2AR were also necessary for the memory impairment upon direct perturbation of the cholinergic system with scopolamine and if A2AR activation was sufficient to trigger memory deficits in naive mice using 3 tests, to probe for short-term memory, namely the object recognition task, inhibitory avoidance and modified Y-maze. The intra-peritoneal (i.p.) administration of scopolamine (1.0 mg/kg) impaired short-term memory performance in 3 tests, namely the object recognition task, inhibitory avoidance and modified Y-maze. The scopolamine-induced amnesia was prevented by the A2AR (SCH 58261, 0.5 mg/kg, i.p.) as well as by A1R antagonist (DPCPX, 1 mg/kg, i.p.) in all tests, except for the modified Y-maze, and both antagonists were devoid of effects on memory or locomotion in *naive* rats. Notably, the activation of A2AR with CGS 21680 (0.1 mg/kg, i.p.) before the training session was sufficient to trigger memory impairment in the 3 tests in naive mice, and effect prevented by SCH 58261 (0.5 mg/kg, i.p.). Furthermore, the intracerebroventricular administration of CGS 21680 (50 nmol) also impaired recognition memory in the object recognition task. These results show that A2AR are necessary and sufficient to trigger memory impairment and they further suggest that A1R might also be selectively engaged to control the cholinergic driven memory impairment.

LISTA DE ABREVIATURAS

Aβ	peptídeo beta amilóide
A1R	receptor de adenosina A ₁
A2AR	receptor de adenosina A _{2A}
AC	adenilato ciclase
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
ADA	adenosina desaminase
ADK	adenosina cinase
AMPC	adenosina 3',5' monofosfato cíclico
ATP	adenosina 5' trifosfato
CA1	Corno de Amon 1 (região do hipocampo)
CGS 21680	2- <i>p</i> -(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine
ChAT	colina-O-acetil-transferase
CPA	N6 -ciclopentiladenosina
DA	doença de Alzheimer
DP	doença de Parkinson
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
ectoN	ectonucleotidases
EI	esquiva inibitória
ENT	transportador equilibrativo de nucleosídeo
i.p.	intraperitoneal
ICV	intracerebroventricular
LTD	depressão de longa duração
LTM	memória de longa duração

LTP	potenciação de longa duração
NMDA	N-metil-D aspartato
P1	receptor purinérgico do tipo 1
RO	reconhecimento de objetos
SCH 58261	2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7 <i>H</i> -pyrazolo[4,3- e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine
SN	sistema nervoso
SNC	sistema nervoso central
STM	memória de curta duração
STZ	estreptozotocina

I. INTRODUÇÃO

I.1 MEMÓRIA

A memória pode ser definida como a capacidade em adquirir, armazenar e recuperar diferentes informações (Izquierdo, 1989). Ela serve de suporte para todas as habilidades, o planejamento e o conhecimento de um indivíduo. (Izquierdo, 1989; Izquierdo & Medina, 1997). A formação de memórias em um indivíduo ocorre por meio de processamentos neurais muito complexos envolvendo diferentes regiões cerebrais, tais como hipocampo, córtex entorrinal, córtex cingulado, córtex pré-frontal e amígdala, além de diferentes neurotransmissores como a dopamina, a noradrenalina, a serotonina e a acetilcolina (Izquierdo & Medina, 1997; Zanatta *et al.*, 1997; Cahill & McGaugh, 1998, Bianchin *et al.*, 1999, Barros *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2005; Roozendaal & McGaugh, 2011).

As memórias podem ser classificadas conforme a sua duração ou conteúdo. De acordo com a duração, as memórias podem ser divididas em pelo menos, duas fases: a memória de curta duração, (STM, do inglês, *short term memory*), independente de síntese protéica, e a memória de longa duração (LTM, do inglês, *long term memory*), que é dependente de síntese protéica (McGaugh, 1966; Izquierdo *et al.*, 1998; Bekinschtein *et al.*, 2007).

A memória de curta duração dura apenas poucas horas após a sua aquisição. Ela requer estruturas como o hipocampo, o córtex entorrinal e a amígdala e envolve mecanismos próprios e distintos que a tornam um processo paralelo e independente da memória de longa duração, pois mesmo quando a memória de curta duração é bloqueada, a memória de longa duração pode ser

formada, diferente do que se pensava anteriormente (Izquierdo *et al.*, 1998; 1999; 2006).

A memória de longa duração leva algumas horas para ser consolidada e durante este processo ela pode ser modulada ou sofrer interferências de alguns fatores, tais como alterações emocionais ou administração de alguns fármacos (McGaugh, 1966). A formação de uma memória de longa duração envolve um processamento neural complexo, incluindo síntese de proteínas e remodelação de sinapses (McGaugh, 1966; Camarota *et al.*, 2000; Bekinschtein *et al.*, 2010). Estudos indicam a participação do hipocampo, córtex entorrinal, amígdala e outras regiões corticais na formação das memórias de longa duração (Izquierdo & Medina, 1997; Cahill & McGaugh, 1998; Bianchin *et al.*, 1999; Barros *et al.*, 2000).

De acordo com o conteúdo, as memórias podem ser classificadas em declarativas (subdivididas em episódicas e semânticas) ou de procedimentos. As memórias declarativas envolvem principalmente o hipocampo e o córtex entorrinal associados entre si e com o córtex cingulado, parietal e com os núcleos basal e lateral da amígdala (Cahill & McGaugh, 1998; Izquierdo *et al.*, 1999; Barros *et al.*, 2000; Squire & Zola-Morgan, 2015). Além disso, as memórias declarativas são classificadas como explícitas, pois envolvem um aprendizado com plena intervenção da consciência e podem durar alguns minutos, dias ou até anos. Já, as memórias de procedimentos envolvem habilidades motoras e sensoriais e são classificadas como implícitas, pois envolvem um aprendizado automático, sem necessidade de intervenção da consciência ou da percepção do processo, e em geral duram por toda a vida do indivíduo (Danion *et al.*, 1995; Izquierdo *et al.*, 1998; Squire & Zola-Morgan, 2015). Este tipo de memória

envolve regiões importantes no desenvolvimento do aprendizado motor tais como o núcleo caudado, a substância nigra e o cerebelo, além das estruturas relacionadas à memória, hipocampo e córtex entorrinal (Izquierdo *et al.*, 2006; Squire & Dede, 2015). A memória declarativa é muito mais suscetível a modulações pelas emoções, ansiedade e estado de ânimo do que as memórias de procedimentos (Cahill & McGaugh, 1998).

No que diz respeito as fases das memórias, as memórias de longa duração podem ser divididas em pelo menos três: a de aquisição, a de consolidação e a de evocação. O processo de aquisição da memória, também chamado de aprendizado, é a fase inicial e determinante para que um indivíduo possa armazenar ou não uma memória. Já a consolidação da memória inicia imediatamente após a sua aquisição e envolve uma série de eventos celulares complexos, envolvendo o aumento da expressão gênica e a síntese de proteínas (Izquierdo, 1989; Carew, 1996). Além disso, a consolidação da memória compreende o período no qual sua fixação definitiva é necessária para que mais tarde (dias ou anos) ela possa ser evocada. Este processo é suscetível a interferências por diversos fatores, entre eles, traumas, fatores emocionais e administração de alguns fármacos (Izquierdo, 1989; McGaugh 1966; 2000). Por fim, a evocação, também conhecida como recordação ou lembrança, é o momento em que a memória será acessada, fundamental para o indivíduo e também para os processos de avaliação da memória (Izquierdo, 1989; Izquierdo *et al.*, 2002). A evocação envolve a ativação sequencial de muitas áreas do cérebro como, por exemplo, a região CA1 do hipocampo, o córtex entorrinal, o córtex parietal e o córtex cingulado (Barros *et al.*, 2001; 2003; Wu *et al.*, 2014). As alterações no estado emocional e no ânimo de um

indivíduo, bem como as intervenções farmacológicas ao longo deste processo, podem afetar de forma positiva ou negativa a formação, a retenção e a evocação de novas memórias (Izquierdo, 1989).

I.2 Protocolos experimentais de memória

A memória humana e dos demais mamíferos são bastante semelhantes no que se refere aos mecanismos essenciais de memória, e muito do conhecimento que se tem disponível sobre os mecanismos neurobiológicos da memória é proveniente de estudos realizados em roedores.

Diversas tarefas são utilizadas para avaliar memória em roedores, tais como a tarefa de reconhecimento de objetos (RO), o labirinto aquático de Morris, o labirinto em Y e a tarefa da esquivinha inibitória (EI). Além destas tarefas avaliarem diferentes tipos de memória, existem ainda variações de protocolos dentro de cada uma delas (Cunha *et al.*, 2008; Botton *et al.*, 2010; Barker *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2012; Akkerman *et al.*, 2012). Desta forma, dependendo do tipo de memória a ser estudada, este fato deve ser levado em consideração para a escolha do protocolo mais adequado. No entanto, é importante salientar que esta variabilidade de protocolos pode tornar difícil a comparação entre os resultados de diferentes experimentos e diferentes grupos de pesquisa.

A capacidade de reconhecer e diferenciar objetos e indivíduos são funções cognitivas importantes e podem ser severamente prejudicadas em doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA) (Irle *et al.*, 1987; Hajilou & Done, 2007). Em roedores, a tarefa mais utilizada para avaliar a memória de reconhecimento, afetada pela DA, é o reconhecimento de objetos (RO).

O RO foi proposto pela primeira vez por Ennaceur & Delacour (1988) e consiste em uma tarefa comportamental bastante simples, baseada na preferência inata dos roedores pela exploração da novidade, sem a necessidade de estímulos externos (aversivos ou não), intervenções de reforço ou punição (Ennaceur & Delacour, 1988, Sik *et al.*, 2003). Esta tarefa consiste em primeiramente habituar os animais em uma arena onde posteriormente serão colocados os objetos. A sessão de treino consiste em expor os animais a dois objetos idênticos e cronometrar o tempo gasto em cada um dos objetos. A sessão de teste consiste em trocar um dos objetos familiares por um objeto novo e cronometrar o tempo gasto em cada um dos objetos. O cálculo do índice de reconhecimento do objeto novo é feito pela razão entre o tempo gasto no objeto novo e a soma do tempo gasto em ambos os objetos (novo e familiar) na sessão de teste. O intervalo entre as sessões e o tempo de duração de cada sessão variam de acordo com o protocolo utilizado.

O RO vem sendo cada vez mais utilizado para avaliação de funções cognitivas e possíveis intervenções de fármacos no processamento das memórias (Sik *et al.*, 2003; Leger *et al.*, 2013). Outra razão para o uso do RO é o fato de que ele nos permite investigar diferentes fases de processamento das memórias. Entretanto, como o traço da memória tende a se deteriorar com o passar do tempo, o melhor desempenho dos roedores nesta tarefa é comumente observado entre 60 e 90 minutos após a sessão de treino (Dodart *et al.*, 1997; Sik *et al.*, 2003; Bevins & Besheer, 2006; van Goethem *et al.*, 2012).

As estruturas cerebrais mais implicadas no RO são o hipocampo, o córtex perirrinal e o córtex posrrinal (Dickerson & Eichenbaum, 2010; Akkerman

et al., 2012). Além de ser muito utilizada para avaliar memória de reconhecimento em roedores, esta tarefa também tem sido aplicada com sucesso em outras espécies animais como cachorros, porcos e cavalos (Callahan *et al.*, 2000; Gifford *et al.*, 2007; Hanggi, 2010) e até mesmo em humanos (Borota *et al.*, 2014).

Outra tarefa baseada na preferência inata dos roedores pela exploração da novidade, sem a necessidade de estímulos aversivos ou intervenções de reforço, é o labirinto em Y, que foi proposto pela primeira vez por Delli *et al.* (1992) para avaliar a memória de reconhecimento espacial. Esta tarefa se baseia em um paradigma de escolha livre na qual a exploração da novidade é mensurada a partir de diferentes exposições a um aparato com três braços idênticos, semelhante a letra “Y”. Na fase de aquisição o acesso a um dos três braços é bloqueado e é permitido ao animal explorar apenas dois braços. A seguir, já na sessão de teste (recuperação da memória), o animal tem livre acesso aos três braços e é avaliado o reconhecimento da novidade em relação aos braços familiares (Delli *et al.*, 2000). Entretanto, uma vez que os três braços do labirinto são idênticos, a discriminação de novidade baseia-se apenas sobre os diferentes aspectos do ambiente que o animal é capaz de perceber a partir de cada braço (memória espacial). A atividade locomotora dos animais nesta tarefa também pode ser avaliada a partir do número de visitas em cada um dos braços (Delli *et al.*, 1992; Delli *et al.*, 2000).

O labirinto em Y é dependente da integridade de circuitos do hipocampo e de receptores NMDA na área CA1 (Petit *et al.*, 2011) e assim como o RO, fornece vantagens para estudos com roedores, uma vez que também se baseia tendência natural dos animais para exploração da novidade,

além de ser uma tarefa precisa, totalmente automatizada e de rápida retenção. Desta forma, evita a necessidade de treinamentos extensivos e uso de reforços positivos ou negativos e permite uma análise detalhada do desempenho dos animais, podendo ser considerada uma ferramenta útil para diversos estudos comportamentais e farmacológicos em roedores (Conrad *et al.*, 1996; Cunha *et al.*, 2008; Canas *et al.*, 2009; Rial *et al.*, 2014).

Além da exploração ao braço novo, esta tarefa também é bastante conhecida e utilizada para avaliação da memória de trabalho, a partir de protocolos que se baseiam no número de alternância entre os três braços do aparato, no qual o animal deve lembrar-se do braço que entrou em uma ocasião anterior para que possa alternar sua escolha em uma tentativa seguinte (Hughes, 2004; Dall'igna *et al.*, 2007; Niimi *et al.*, 2013; Sierksma *et al.*, 2014; Pickering *et al.*, 2015).

Já a tarefa de esquiva inibitória (EI) caracteriza-se por associar um estímulo aversivo (choque) a um teste de aprendizado e memória. O aparato da EI consiste em uma caixa cujo solo é feito de barras de cobre que estão conectadas a rede elétrica. Na sessão de treino, o animal é colocado em uma plataforma dentro da caixa e o tempo que ele leva para descer com as quatro patas para as barras de cobre é cronometrado. Imediatamente após o animal descer da plataforma, eles recebe um choque leve durante 2 segundos nas patas. Na sessão de teste o animal é recolocado na plataforma do aparato e a latência para descer da plataforma é usada como indicador de retenção da memória. Nesta sessão, o animal não recebe choque. A análise dos resultados é expressa pelo tempo que o animal leva para descer da plataforma na sessão de treino e na sessão de teste (latência). A retenção da memória poderá ser

avaliada em diferentes momentos após a sessão de treino, assim como a intensidade do choque também pode variar, dependendo do protocolo utilizado (Gold, 1986; Cammarota *et al.*, 2003, Botton *et al.*, 2010).

A consolidação da memória na esQUIVA inibitória requer a ativação de uma série de vias de sinalização intracelular na região CA1 do hipocampo, córtex entorrinal, córtex cingulado e córtex parietal, com intuito de provocar modificações duradouras nas sinapses, responsáveis pela estabilização do traço mnemônico (Izquierdo & Medina, 1997; Blake *et al.*, 2014; Giovannini *et al.*, 2015). Sabe-se que a amígdala, por meio de mecanismos que envolvem a liberação de noradrenalina, participa ativamente da consolidação da memória na esQUIVA inibitória (Cahill *et al.*, 1996; Roozendaal & McGaugh, 2011). Além das estruturas mencionadas, também estão envolvidos nesta tarefa os neurotransmissores dopamina, serotonina, glutamato e acetilcolina (Barros *et al.*, 2001; Baratti *et al.*, 2009; Simonyi *et al.*, 2010; Cercato *et al.*, 2014; Menezes *et al.*, 2015; Giovannini *et al.*, 2015).

Tanto o reconhecimento de objetos (Winters *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008a; Botton *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2012) quanto o labirinto em Y (Dall'igna *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2008; Cognato *et al.*, 2010) e a esQUIVA inibitória (Kopf *et al.*, 1999; Dall'igna *et al.*, 2007; Botton *et al.*, 2010) vêm sendo bastante utilizados com intervenções farmacológicas em diferentes momentos dos protocolos de aprendizado, tais como pré-treino, pós-treino ou pré-teste. Dependendo do momento em que a intervenção farmacológica é realizada, podem ser produzidos diferentes efeitos (positivos ou negativos) sobre as fases de aquisição, consolidação e evocação das memórias (Izquierdo, 1989; Winters *et al.*, 2008).

I.3 ADENOSINA

A adenosina é um nucleosídeo endógeno que participa de uma ampla variedade de funções biológicas básicas, incluindo a biossíntese de nucleotídeos e o metabolismo energético celular (Eltzschig, 2009). No Sistema Nervoso Central (SNC) ela age em todas as células, incluindo os neurônios e as células gliais, atuando como um neuromodulador, controlando a excitabilidade neuronal, os processos sinápticos e a regulação da liberação de neurotransmissores (Sebastião & Ribeiro, 2000; Boison, 2007; Boison, 2012; Chen *et al.*, 2013).

A adenosina pode ser produzida a partir da hidrólise do ATP (do inglês *adenosine triphosphate*) pela cascata enzimática das ectonucleotidases (ectoN), a partir da degradação do AMP cíclico (AMPC) ou ainda pode ser produzida no meio intracelular e após ser transportada para o meio extracelular, via transportador equilibrativo de nucleosídeo (ENT) (Brundege *et al.*, 1997; Latini & Pedata, 2001; Eltzhig, 2009). A adenosina intracelular possui metabolismo rápido, podendo ser convertida em AMP pela adenosina cinase (ADK) ou ser convertida em inosina por meio da ação da enzima adenosina desaminase (ADA) (Hershfield, 2005; Benarroch, 2008; Eltzhig, 2009; Figura 1).

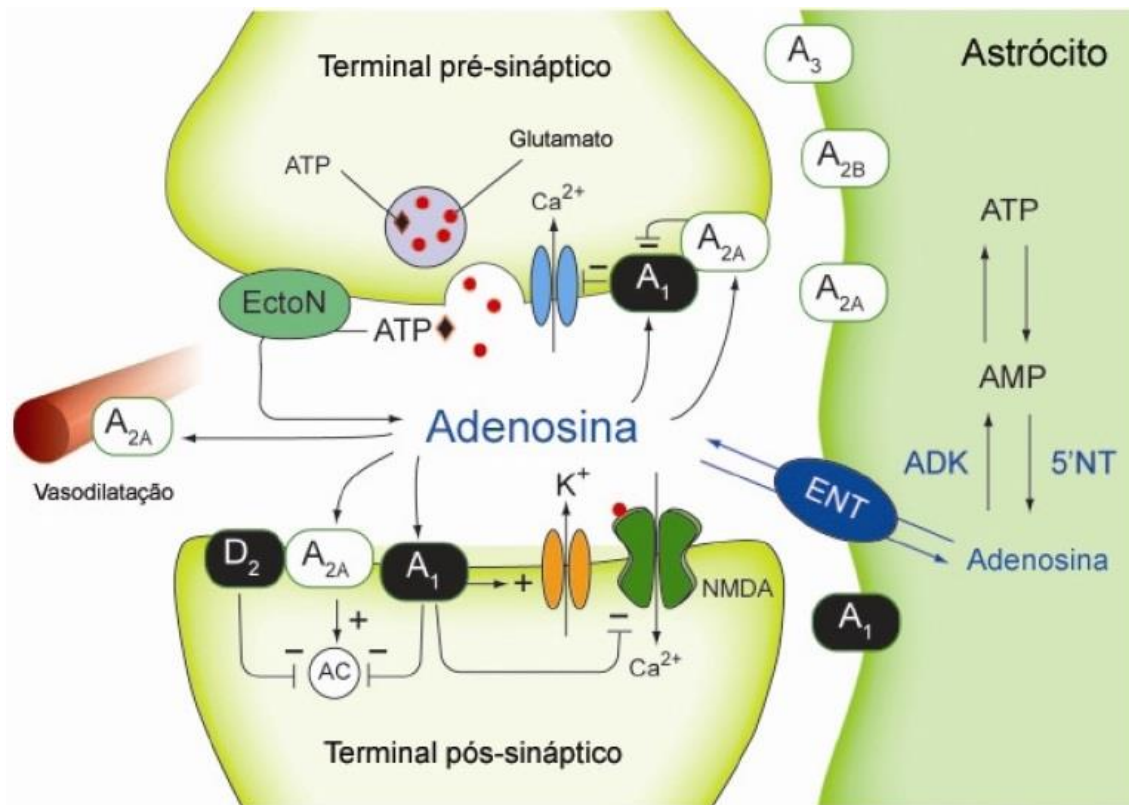


Figura 1. Versão simplificada de uma sinapse mostrando as principais características da sinalização de adenosina no SNC e seus principais mediadores, os receptores A_1 e A_{2A} . A figura mostra as duas principais fontes de adenosina extracelular, a primeira por meio da conversão extracelular da adenosina trifosfato (ATP) pela ação das ectonucleotidases (EctoN) e a segunda a partir do transporte de adenosina intracelular via transportador equilibrativo de nucleosídeo (ENT). Os receptores A_1 inibem a liberação de glutamato e as respostas pré-sinápticas mediadas pelos receptores N-metil-D aspartato (NMDA), além disso estes receptores também inibem a adenilato ciclase (AC) e aumentam a condutância aos íons potássio (K^+) e inibem os canais de cálcio (Ca^{2+}) pré-sinápticos. Já os receptores A_{2A} estimulam a AC e antagonizam os efeitos inibitórios dos receptores A_1 sobre a liberação de glutamato. Eles também podem formar dímeros com os receptores A_1 ou com os receptores de dopamina D_2 e antagonizar os efeitos da dopamina em neurônios estriado-palidais. ADK = adenosina cinase; AMP = adenosina monofosfato; 5'NT = 5'nucleotidase (adaptado de Benarroch, 2008).

As ações da adenosina ocorrem a partir da sua ligação com quatro subtipos de receptores purinérgicos do tipo P1 (receptores inibitórios A_1 e A_3 e receptores facilitatórios A_{2A} e A_{2B}). Estes receptores encontram-se acoplados à proteína G e têm sete domínios transmembrana formados por aminoácidos

hidrofóbicos (Fredholm *et al.*, 2001; 2005). A ativação dos receptores A_1 ou A_3 leva à atenuação dos níveis de AMPc intracelular, enquanto que a ativação dos receptores A_{2A} ou A_{2B} está associada com a elevação dos níveis de AMPc (Eltzschig, 2009).

Os receptores de adenosina A_1 são amplamente distribuídos por todo o Sistema Nervoso Central (SNC), principalmente em regiões como o córtex, o hipocampo, o cerebelo e a medula espinhal (Daly & Padgett, 1992; Ribeiro *et al.*, 2003) e inibem a adenilato ciclase (AC) (Daly & Padgett, 1992). Além disso, estes receptores inibem a liberação de glutamato e as respostas pré-sinápticas mediadas pelos receptores N-metil-D aspartato (NMDA) (Brambilla *et al.*, 2005). Esses receptores apresentam um papel inibitório frente à transmissão excitatória do SNC e oferecem neuroproteção contra danos cerebrais (Fredholm *et al.*, 2005).

Já os receptores A_{2A} são encontrados em maior densidade no bulbo olfatório e no estriado, e em menor nível nas outras regiões cerebrais. Ao contrário dos receptores A_1 , os receptores A_{2A} estimulam a adenilato ciclase e antagonizam os efeitos inibitórios dos receptores A_1 sobre a liberação de glutamato (Daly & Padgett, 1992; Dixon *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2003; Fredholm *et al.*, 2005; Rebola *et al.*, 2005; Eltzschig, 2009). Os receptores A_{2A} estão bastante relacionados com a modulação da plasticidade dos circuitos neuronais, tais como a aprendizagem e a memória (Zhou *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2011).

O papel essencial da adenosina na manutenção da homeostase cerebral, controle da transmissão sináptica, liberação de neurotransmissores e excitabilidade neuronal contribui para a codificação da informação nos circuitos

neuronal, e ocorre principalmente por intermédio dos seus receptores A_1 e A_{2A} (Sebastião & Ribeiro, 1996; Cunha, 2001; Fredholm *et al.*, 2005, Cunha, 2008). A adenosina também desempenha um papel importante em diferentes comportamentos que podem variar desde a locomoção até o humor (Chen *et al.*, 2013). Uma vez que a adenosina por meio da ação em receptores A_1 e A_{2A} participa de fenômenos associados à plasticidade sináptica, no decorrer dos anos seu papel nos processos de aprendizado e memória vem sendo elucidado (de Mendonça & Ribeiro, 1994; de Mendonça *et al.*, 1997).

I.4 CAFEÍNA E MEMÓRIA

A participação dos receptores de adenosina nos processos cognitivos vem sendo reconhecida ao longo dos anos por meio dos estudos com cafeína. A cafeína pertence à classe das metilxantinas, sendo considerada o psicoestimulante mais consumido mundialmente. As ações da cafeína ocorrem por meio do antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} (Fredholm & Persson, 1982; Fredholm *et al.*, 1999).

Muitos trabalhos vêm investigando os efeitos da administração de cafeína sobre o desempenho cognitivo tanto em animais quanto em humanos. Em animais, estudos relacionados à DA revelaram que a cafeína previne a morte de neurônios de cerebelo de roedores causada pelo peptídeo beta amiloide ($A\beta$), o principal componente das placas senis que se acumulam no cérebro na DA (Dall'igna *et al.*, 2003). Outro estudo também relacionado à DA, verificou que a cafeína provocou uma melhora da memória associada à redução da fosforilação da proteína tau e fragmentos proteolíticos no hipocampo de roedores (Laurent *et al.*, 2014), evidenciando que a ingestão

moderada de cafeína é benéfica tanto no modelo animal pela infusão do A β quanto no da proteína tau hiperfosforilada. Além disso, outros estudos utilizando animais demonstram que a cafeína proporciona efeitos benéficos na restauração de habilidades cognitivas perdidas (Prediger *et al.*, 2005a) e previne a neurodegeneração em modelos transgênicos para a Doença de Alzheimer (Arendash *et al.*, 2006; Arendash & Cao, 2010).

Resultados do nosso grupo mostraram que o tratamento com cafeína em animais melhora a memória de reconhecimento em adultos e previne o déficit cognitivo decorrente da idade em idosos (Costa *et al.*, 2008a; 2008b). Mais recentemente, nosso grupo também demonstrou que o consumo crônico de cafeína reverte o prejuízo da memória de curto e de longo prazo na esQUIVA inibitória em animais de meia-idade (Sallaberry *et al.*, 2013). Um outro estudo realizado por Angellucci e colaboradores (1999) mostrou que quando a cafeína foi administrada após o treino (na fase de consolidação da memória) ou antes do teste (na evocação da memória) na tarefa de EI, ela melhorou o desempenho dos animais. O mesmo não foi observado quando a cafeína foi administrada antes do treino (aquisição da memória), pois os animais não apresentaram melhora no desempenho após a administração da cafeína (Angellucci *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem que a cafeína pode ou não afetar as diferentes fases de memória, dependendo da tarefa escolhida e das diferentes intervenções farmacológicas nos processos mnemônicos.

Com relação aos estudos realizados em humanos, diversos deles apontam que a ingestão habitual de cafeína (consumo crônico) atenua a disfunção cognitiva durante o envelhecimento ou na DA. Um estudo retrospectivo relacionou inversamente o consumo de cafeína com a demência

associada à DA (Maia & de Mendonça, 2002). Outros estudos epidemiológicos demonstraram que o consumo regular e moderado de cafeína previne o declínio cognitivo, principalmente em mulheres idosas (Johnson-Kozlow *et al.* 2002; Ritchie *et al.*, 2007). Eskelinen e colaboradores (2009) investigaram os indivíduos de meia-idade que consumiam doses moderadas de café (3-5 xícaras por dia) e verificaram que estes apresentaram menor risco de demência em comparação aos que não consumiam a bebida. Posteriormente, um outro estudo com indivíduos de meia-idade mostrou que a ingestão de cafeína foi associada a um risco reduzido de demência ou um atraso no seu início, especialmente nos indivíduos que já apresentavam um comprometimento cognitivo leve (Cao *et al.*, 2012).

Mais recentemente, um estudo realizado por Borota e colaboradores (2014), também em humanos, avaliou o desempenho de indivíduos adultos que receberam cafeína (200 mg) ou placebo após a aquisição em uma tarefa de reconhecimento visual de objetos. O teste ocorreu 24 horas após e os indivíduos que receberam cafeína foram capazes de reconhecer quando os objetos apresentados no teste eram semelhantes, mas não idênticos, aos objetos apresentados no treino. Já os que receberam placebo classificaram estes objetos como idênticos aos já vistos anteriormente. Neste estudo também foi realizada a administração de cafeína antes do teste, sendo que não houve uma melhora na consolidação da memória em comparação ao grupo que recebeu placebo.

Alguns pesquisadores vem investigando os efeitos da abstinência de cafeína em humanos. Mitchell e colaboradores (1995) mostraram que os sintomas de abstinência de cafeína não estão necessariamente relacionados

com o aumento do consumo de cafeína. A partir deste estudo realizado com usuários regulares de cafeína, eles avaliaram o efeito da privação e da auto-administração de cafeína após 33 horas de privação completa, parcial (50%) ou sem privação de cafeína (100%). Os sintomas de abstinência de cafeína (baseados nos questionários respondidos pelos usuários) ocorreram após a privação completa mas não após a privação parcial de cafeína e neste estudo, a auto-administração da cafeína não foi correlacionada com a abstinência dos usuários.

Um outro estudo investigou os efeitos da administração de diferentes doses agudas de cafeína em homens e mulheres que não eram usuários diários de cafeína. Cento e dois indivíduos receberam cafeína (50, 150 e 450 mg) ou placebo e após participaram de quatro sessões experimentais envolvendo tarefas de atenção, memória de curto prazo e desempenho psicomotor. Os indivíduos que receberam cafeína apresentaram aumento na excitação, humor e vigilância e melhoraram o desempenho em algumas tarefas de memória, mostrando que os efeitos comumente observados a partir da administração de cafeína também ocorrem em pessoas que não são usuários contínuos de cafeína (Childs & de Wit, 2006).

Cornelis e colaboradores (2007) associaram o polimorfismo genético dos receptores de adenosina A_{2A} com o consumo habitual de cafeína e outro estudo mostrou que a interação entre os receptores A_{2A} e D2 podem ser responsáveis pela resposta negativa à cafeína em certos indivíduos (Childs *et al.*, 2008), sugerindo uma importância na interação entre a dopamina e adenosina nos efeitos da cafeína.

A respeito da influência genética no consumo de cafeína, um estudo realizado por Kendler & Prescott (1999) avaliou o padrão de consumo, tolerância, abstinência e intoxicação por administração de cafeína em gêmeos monozigóticos e dizigóticos e verificou que as semelhanças no padrão de ingestão de cafeína eram muito maiores nos gêmeos monozigóticos do que nos dizigóticos, mostrando que o consumo de cafeína, semelhante ao consumo de outras drogas psicoativas, é influenciada por fatores genéticos.

I.5 RECEPTORES DE ADENOSINA E MEMÓRIA

Diversos trabalhos em animais utilizando cafeína, agonistas e antagonistas seletivos dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} destacam a importância destes receptores e da adenosina nos processos de memória.

A administração de agonistas seletivos para os receptores de adenosina A_1 , N(6)-cyclohexyladenosine (CHA) e N(6)-phenylisopropyladenosine (R-PIA), uma hora antes do treino na esquiva passiva causou prejuízos na aquisição da memória de maneira dose dependente (Zarrindast & Shafaghi, 1994). Em outro estudo realizado por Ohno & Watanabe (1996) a infusão bilateral do agonista A_1 (CHA) no hipocampo dorsal de roedores aumentou significativamente o número de erros em uma tarefa que avalia memória de trabalho, e foi prevenido por meio da infusão prévia de 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX, antagonista A_1). Neste mesmo estudo a infusão de 2-*p*-(2-Carboxyethyl) phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (CGS 21680, agonista A_{2A}) não prejudicou a memória de trabalho (Ohno & Watanabe, 1996). Animais (com restrição de água) foram treinados na esquiva passiva com acesso a água, associado a um choque. Em doses mais elevadas (1,5 e 2,25

$\mu\text{mol/kg}$), a administração de N⁶-ciclo-pentiladenosina (CPA, agonista A₁) antes do treino diminuiu a latência para a busca de água, sendo que a administração prévia de DPCPX (antagonista A₁) preveniu esse déficit de retenção de memória (Normile & Barraco, 1991). Além disso, Pereira e colaboradores (2002) mostraram que a infusão bilateral de DPCPX (50 nM) no córtex cingulado posterior de ratos, imediatamente após o treino na esQUIVA inibitória facilita a memória de curto e de longo prazo. E a estimulação dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} pelos agonistas CPA e CGS 21680, respectivamente, no córtex cingulado posterior prejudica a recuperação da memória em roedores na tarefa de esQUIVA inibitória (Pereira *et al.*, 2005). Esses resultados demonstram que a administração de agonistas de receptores de adenosina A₁ prejudicam a memória, enquanto o bloqueio destes receptores facilita a memória em roedores, demonstrando a importância dos receptores A₁ nos processos de memória.

Mais recentemente alguns estudos vêm sugerindo que, principalmente a partir dos receptores de adenosina do tipo A_{2A}, a cafeína previne a neurodegeneração e conseqüentemente atua na prevenção dos prejuízos cognitivos, sugerindo um papel crucial para os receptores A_{2A} nos processos de memória (Dall'Igna *et al.*, 2003; 2007; Canas *et al.*, 2009; Espinosa *et al.*, 2013). A administração de cafeína e de antagonistas seletivos dos receptores A_{2A} foram capazes de prevenir déficits cognitivos em modelos de déficit de atenção e hiperatividade (Pires *et al.*, 2009), estresse crônico imprevisível (Kaster *et al.*, 2015), convulsão (Cognato *et al.*, 2010), envelhecimento (Leite *et al.*, 2011) e em trabalhos que induziram a Doença de Parkinson (DP) em

modelos animais (Xu *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2011; Kachroo & Schwarzschild, 2012; Palacios *et al.*, 2012).

Com relação a doença de Parkinson é importante salientar que a associação entre os receptores de adenosina A_{2A} e os receptores de dopamina D2 nos núcleos da base (Ferré *et al.*, 1997; Schwarzschild *et al.*, 2006) fornece evidências para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DP, uma vez que antagonistas de receptores de adenosina, particularmente os antagonistas A_{2A} , não só melhoram o desempenho motor na DP (Chen *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2002), como também melhoram o desempenho cognitivo dos animais (Mihara *et al.*, 2007). Ainda, alguns antagonistas de receptores de adenosina A_{2A} , tais como o KW-6002, já estão em fase III de ensaio clínico para o tratamento da Doença de Parkinson e estão sendo considerados fármacos seguros e promissores (Chen *et al.*, 2013; Chen, 2014).

Já em relação a Doença de Alzheimer, modelos animais desta doença mostraram que antagonistas dos receptores A_{2A} foram capazes de proteger neurônios de roedores contra a toxicidade induzida por $A\beta$, sendo que este efeito não foi observado pela administração de antagonistas dos receptores A_1 (Dall'Igna *et al.*, 2007). Também foi observado que animais com superexpressão dos receptores de adenosina A_{2A} apresentaram prejuízos na memória (Giménez-Llort *et al.*, 2007) e que o bloqueio dos receptores A_{2A} preveniu a sinaptotoxicidade e os prejuízos de memória induzidos por $A\beta$ (Canas *et al.*, 2009). Anteriormente, em um estudo também realizado em roedores, Dall'Igna e colaboradores (2003) já haviam sugerido o envolvimento dos receptores A_{2A} na prevenção da neurotoxicidade induzida pelo peptídeo β -amilóide em neurônios cerebelares (Dall'Igna *et al.*, 2003). Resultados do

nosso grupo, em um modelo experimental de demência esporádica induzido por estreptozotocina (STZ), mostraram um aumento do imunoconteúdo e da expressão dos receptores A_{2A} no hipocampo (mas não dos receptores A_1), acompanhado por prejuízos na memória de reconhecimento (Espinosa *et al.*, 2013). Recentemente, um grupo de pesquisadores realizou experimentos utilizando a ativação optogenética da sinalização dos receptores de adenosina A_{2A} no hipocampo (Li *et al.*, 2015). Este estudo demonstrou que a ativação optogenética do receptor A_{2A} foi suficiente para comprometer a memória espacial no labirinto em Y.

Estes resultados sugerem uma participação fundamental do bloqueio dos receptores A_{2A} na restauração da memória e nos efeitos neuroprotetores da cafeína. Apesar disso, o papel dos receptores A_{2A} nos processos mnemônicos (ou seja, na ausência de prejuízos) ainda foi muito pouco explorado.

I.6 SISTEMA COLINÉRGICO, ADENOSINA E MEMÓRIA

A acetilcolina (ACh) é um importante mediador químico das sinapses no sistema nervoso central e periférico, bem como na junção neuromuscular. No sistema nervoso central (SNC) ela atua como um modulador de processos cognitivos, tais como a memória e o aprendizado (McQuiston, 2014). A síntese da ACh ocorre a partir da acetil-coenzima A e da colina, por ação da enzima Colina-O-Acetil-Transferase (ChAT) (Siegel *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2008). Uma vez sintetizada, a acetilcolina é transportada e armazenada em vesículas sinápticas e após ser liberada por exocitose, ela interage especificamente com os receptores colinérgicos presentes nas membranas pré e pós-sinápticas. A

ação da acetilcolina cessa quando ela é hidrolisada em acetato e colina pela enzima acetilcolinesterase (AChE), presente na fenda sináptica (Fujii *et al.*, 2008; figura 2).

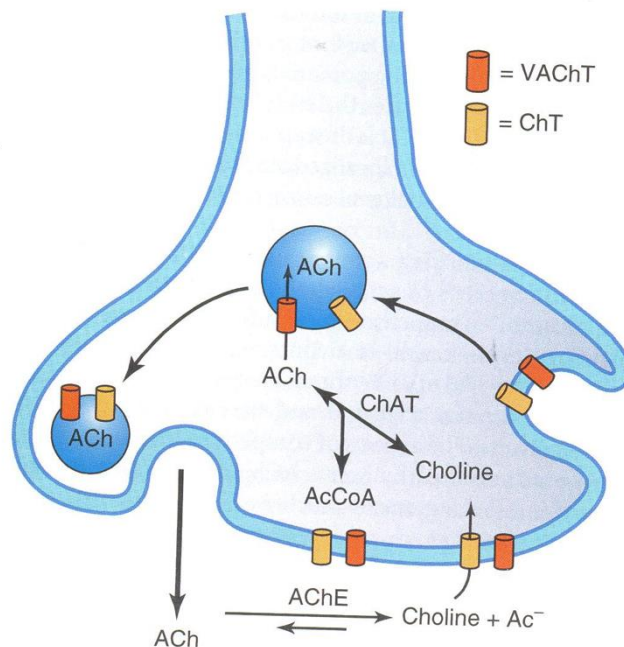


Figura 2 – Visão geral do transporte, síntese e degradação de acetilcolina em um terminal nervoso pré-sináptico colinérgico. A colina é transportada da membrana para o citoplasma, a partir do transportador de colina (ChT). A acetilcolina é formada no citoplasma a partir de colina e de acetil-coenzima A, por meio da ação da enzima Colina-O-Acetil-Transferase (ChAT) nas imediações das vesículas sinápticas. O transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT) concentra a acetilcolina nas vesículas e mediante estimulação nervosa, despolarização e entrada de cálcio (Ca^{2+}), as vesículas contendo acetilcolina (ACh) se fundem com a membrana e liberam seu conteúdo. Esta fusão resulta em um aumento de ACh na fenda sináptica, tornando-a ativa. A ação da acetilcolina cessa quando ela é hidrolisada em acetato e colina pela ação da acetilcolinesterase (AChE), permitindo a recaptção de grande parte de colina por ChT. Por causa das diferentes composições iônicas no meio extra e intracelular, o ChT somente encontra-se ativo na membrana das células nervosas, e inativo nas vesículas, enquanto o VAcHT encontra-se ativo nas vesículas sinápticas e inativo na membrana das células nervosas (Adaptado de Siegel *et al.*, 2006).

As ações da acetilcolina nos processos cognitivos ocorrem a partir dos seus receptores colinérgicos do tipo muscarínicos e nicotínicos (Dale, 1914). Os receptores nicotínicos pertencem à família de receptores ionotrópicos e, quando ativados, adquirem a conformação de canal aberto permitindo a entrada de íons sódio e potássio (Cox *et al.*, 2008). Já os receptores muscarínicos constituem uma família de receptores acoplados a proteína G, contendo sete domínios transmembrana. Os receptores muscarínicos são subdivididos em cinco grupos distintos (M1- M5) (Bonner, 1989; Caulfield, 1993).

Os receptores muscarínicos estão particularmente envolvidos na memória e no aprendizado, participam das respostas emocionais, da modulação do estresse e da regulação do sono e vigília. Os subtipos de receptores M1 e M2 compõem importantes vias de sinalização para a formação da memória e são abundantemente expressos no córtex cerebral, hipocampo, substância negra e estriado (Levey *et al.*, 1991; Hamilton *et al.*, 2001; Nathanson, 2008).

A ativação dos receptores excitatórios (M1) ativa a proteína G, que ativa a fosfolipase C (PLC), induzindo a despolarização neuronal por meio do fechamento dos canais de potássio e ativação dos canais de cálcio enquanto que a ativação dos receptores inibitórios (M2) ativa a proteína G, que inibe a adenilato-ciclase (AC), induzindo a hiperpolarização neuronal por fechamento dos canais de cálcio e abertura dos canais de potássio (Groleau *et al.*, 2015; figura 3).

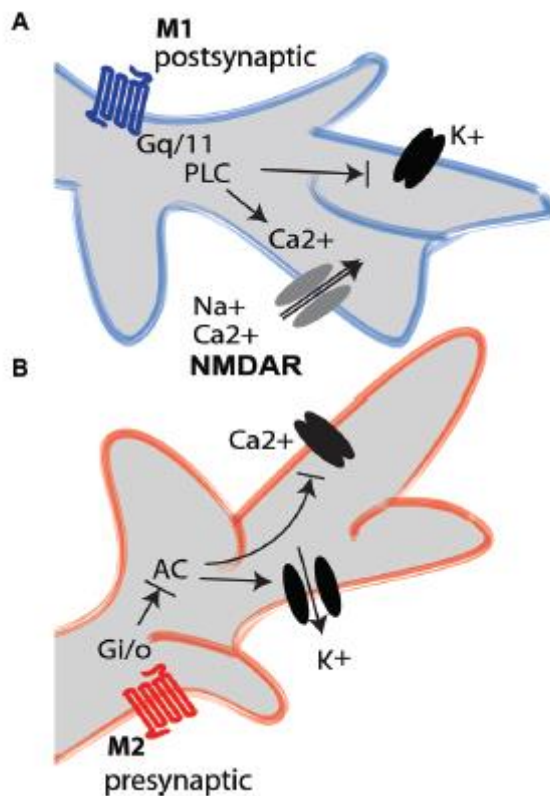


Figura 3 – Mediação intracelular dos receptores muscarínicos M1 e M2 de acetilcolina. (A) A ativação dos receptores M1 excitatórios (azul) ativa a proteína G, que ativa a fosfolipase C (PLC). Isto induz a despolarização do neurônio por meio do fechamento dos canais de K^+ e ativação dos canais de Ca^{2+} que aumentam a concentração intracelular de cálcio. Os receptores M1 encontram-se principalmente nos terminais pós-sinápticos. (B) A ativação dos receptores M2 inibitórios (vermelho) ativa a proteína G, que inibe a adenilato-ciclase (AC). Isto induz a hiperpolarização da célula por fechamento dos canais de Ca^{2+} e abertura dos canais de K^+ . Os receptores M2 encontram-se principalmente nos terminais pré-sinápticos. K^+ = potássio, Ca^{2+} = cálcio (adaptado de Groleau *et al.*, 2015).

Agonistas muscarínicos facilitam o aprendizado e a memória (Jerusalinsky *et al.*, 1997). Já os antagonistas de receptores muscarínicos prejudicam a memória (Robbins *et al.*, 1997; Doralp & Leung, 2008; Miranda & Bermúdez-Rattoni, 2007; Botton *et al.*, 2010; Tinsley *et al.*, 2011), inclusive em humanos (Riedel *et al.*, 1995).

A escopolamina é um antagonista não seletivo de receptores colinérgicos muscarínicos, também chamado de fármaco anticolinérgico, que

possui propriedades amnésicas já bem estabelecidas (Klinkenberg & Blokland, 2010; Wu *et al.*, 2012). Sua ação envolve a inibição da ação da acetilcolina no SNC e parece ser um potente inibidor das fases de aquisição e recuperação, mas um fraco inibidor do processo de consolidação da memória (Izquierdo, 1989). A administração periférica ou intracerebral de escopolamina produz déficits em uma variedade de testes de memória em roedores, tais como no labirinto em T (*T-maze*) (De-Mello & Carobrez, 2002), a esQUIVA inibitória (Roldán *et al.*, 2001; Botton *et al.*, 2010) e o reconhecimento de objetos (Dodart *et al.*, 1997; Rutten *et al.*, 2006). Além disso, estudos utilizando escopolamina sugerem que a memória de reconhecimento depende da ativação de receptores muscarínicos no córtex perirrinal (Tang *et al.*, 1997). Desta forma, a escopolamina pode ser considerada adequada para estudos de aprendizado e memória envolvendo o sistema colinérgico, uma vez que a atividade colinérgica faz parte dos processos de formação da memória.

Na diminuição progressiva da função cognitiva que ocorre na DA, sabe-se que a perda de memória de curto prazo está associada a uma alteração no sistema colinérgico (Allgaier & Allgaier, 2014). A hipofunção do sistema colinérgico é considerada um evento inicial para a deterioração da memória decorrente da idade e na DA. As alterações são observadas tanto na quantidade de receptores muscarínicos em diversas regiões cerebrais quanto na qualidade da sinalização intracelular induzida por estes receptores (Cummings & Back, 1998; Bartus, 2000; Sarter & Parikh, 2005).

Estudos utilizando animais mostraram que a administração de cafeína (10 mg / kg, i.p.) durante 4 dias consecutivos preveniu prejuízos de memória (de curto e de longo prazo) causados pela administração de escopolamina pós-

treino na esQUIVA inibit6ria e no reconhecimento de objetos em camundongos adultos (Botton *et al.*, 2010). Al6m disso, a cafe6na administrada cronicamente aumenta a libera76o de acetilcolina no c6rtex pr6-frontal de ratos adultos (Acqvas *et al.*, 2002) e estudos comportamentais tamb6m mostraram um envolvimento do sistema adenosin6rgico nos d6ficits mnem6nicos causados pela administra76o de antagonistas colin6rgicos (Rubaj *et al.*, 2003; Cunha *et al.*, 2008). 6 medida em que ocorre o aumento da ativa76o dos receptores A_{2A} e a inibi76o dos receptores A₁, ocorre a inibi76o da libera76o de acetilcolina no c6rtex l6mbico (Cunha *et al.*, 1994; Rodrigues *et al.*, 2008). Desta forma, 6 plaus6vel que o bloqueio seletivo dos receptores A₁, ao inv6s dos receptores A_{2A}, seja capaz de evitar a hipofun76o colin6rgica.

Em seres humanos, um estudo avaliou os efeitos da cafe6na sobre o comprometimento de mem6ria causado por escopolamina em 16 volunt6rios saud6veis, que receberam cafe6na (250 mg) ou placebo. A cafe6na preveniu o comprometimento de mem6ria (de curto e de longo prazo) causado por escopolamina, e tamb6m melhorou a qualidade e a velocidade da recupera76o da mem6ria em uma tarefa que envolveu o aprendizado de palavras (Riedel *et al.*, 1995).

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o envolvimento dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} no comprometimento da memória de reconhecimento, aversiva e espacial induzido pelo bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos.

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o impacto da manipulação farmacológica de receptores de adenosina A_1 e A_{2A} nas tarefas de reconhecimento de objetos, esQUIVA inibitória e labirinto em Y em camundongos adultos.

- Caracterizar o papel dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} sobre o comprometimento da memória causado pelo antagonista não seletivo de receptores muscarínicos – escopolamina - nas tarefas de reconhecimento de objetos, esQUIVA inibitória e labirinto em Y em camundongos adultos.

PARTE II

CAPÍTULO I

Adenosine A_{2A} receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice.

Artigo publicado no periódico British Journal of Pharmacology

RESEARCH PAPER

Adenosine A_{2A} receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice

N Pagnussat¹, A S Almeida¹, D M Marques¹, F Nunes¹, G C Chenet¹,
P H S Botton¹, S Mioranza¹, C M Loss¹, R A Cunha^{2,3} and
L O Porciúncula¹

¹Laboratório de Estudos sobre o Sistema Purinérgico, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil,

²Center for Neuroscience and Cell Biology, and ³Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

Correspondence

Lislane O. Porciúncula,
Departamento de Bioquímica,
ICBS, UFRGS, Rua Ramiro
Barcelos 2600-anexo, Porto
Alegre, RS 90035-003, Brazil.
E-mail:
loporciuncula@yahoo.com

Received

19 August 2014

Revised

31 March 2015

Accepted

13 April 2015

BACKGROUND AND PURPOSE

Caffeine (a non-selective adenosine receptor antagonist) prevents memory deficits in aging and Alzheimer's disease, an effect mimicked by adenosine A_{2A} receptor, but not A₁ receptor, antagonists. Hence, we investigated the effects of adenosine receptor agonists and antagonists on memory performance and scopolamine-induced memory impairment in mice.

EXPERIMENTAL APPROACH

We determined whether A_{2A} receptors are necessary for the emergence of memory impairments induced by scopolamine and whether A_{2A} receptor activation triggers memory deficits in naïve mice, using three tests to assess short-term memory, namely the object recognition task, inhibitory avoidance and modified Y-maze.

KEY RESULTS

Scopolamine (1.0 mg·kg⁻¹, i.p.) impaired short-term memory performance in all three tests and this scopolamine-induced amnesia was prevented by the A_{2A} receptor antagonist (SCH 58261, 0.1–1.0 mg·kg⁻¹, i.p.) and by the A₁ receptor antagonist (DPCPX, 0.2–5.0 mg·kg⁻¹, i.p.), except in the modified Y-maze where only SCH58261 was effective. Both antagonists were devoid of effects on memory or locomotion in naïve rats. Notably, the activation of A_{2A} receptors with CGS 21680 (0.1–0.5 mg·kg⁻¹, i.p.) before the training session was sufficient to trigger memory impairment in the three tests in naïve mice, and this effect was prevented by SCH 58261 (1.0 mg·kg⁻¹, i.p.). Furthermore, i.c.v. administration of CGS 21680 (50 nmol) also impaired recognition memory in the object recognition task.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

These results show that A_{2A} receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment and further suggest that A₁ receptors might also be selectively engaged to control the cholinergic-driven memory impairment.

Abbreviations

AD, Alzheimer's disease; CGS 21680, 3-[4-[2-[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(ethylcarbamoyl)-3,4-dihydroxy-oxolan-2-yl]purin-2-yl]amino]ethyl]phenyl]propanoic acid; DPCPX, 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine; M1, muscarinic receptors type 1; SCH 58261, 7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine; SCO, scopolamine; veh, vehicle

Tables of Links

TARGETS	
A ₁ receptor	M ₁ receptor
A _{2A} receptor	

LIGANDS		
ACh	CGS 21680	Scopolamine
Adenosine	DPCPX	SCH 58261

These Tables list key protein targets and ligands in this article which are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Pawson *et al.*, 2014) and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14 (Alexander *et al.*, 2013).

Introduction

Adenosine plays an essential role in the maintenance of brain homeostasis mainly acting through inhibitory adenosine A₁ receptors and facilitatory adenosine A_{2A} receptors (Fredholm *et al.*, 2005). The parallel and combined effects mediated by A₁ and A_{2A} receptors control basal synaptic transmission and plasticity, respectively, and contribute to the encoding of salient information in neuronal circuits (Cunha, 2008), thus affecting different behaviours ranging from locomotion to mood (Chen *et al.*, 2013). In particular, the participation of adenosine receptors in cognitive processes has been recognized over the years, as heralded by the ability of caffeine, a non-selective adenosine receptor antagonist, to control memory performance (reviewed in Cunha and Agostinho, 2010). Thus, the acute administration of caffeine improves the performance of rodents in the object recognition task (Costa *et al.*, 2008; Botton *et al.*, 2010) and inhibitory avoidance (Angelucci *et al.*, 1999) as well as the performance of discrimination tasks in humans (Borota *et al.*, 2014). Furthermore, the chronic consumption of caffeine attenuates cognitive dysfunction observed during aging or Alzheimer's disease (AD) in humans (Eskelinen *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2012) and animal models (Arendash *et al.*, 2006; Dall'Igna *et al.*, 2007; Espinosa *et al.*, 2013; Laurent *et al.*, 2014). From results obtained in animal models, it was further concluded that the anti-amnesic effect of caffeine in AD was mimicked by the selective blockade of A_{2A}, but not of A₁ receptors (Dall'Igna *et al.*, 2007; Canas *et al.*, 2009).

The hypofunction of the cholinergic system is considered a trigger for memory deterioration in aging and AD (reviewed in Bartus, 2000), in accordance with the well-documented amnesic effects of the muscarinic receptor antagonist, scopolamine (reviewed in Klinkenberg and Blokland, 2010). Notably, caffeine can prevent scopolamine-induced memory impairment in rodents (Nikodijević *et al.*, 1993; Botton *et al.*, 2010) and humans (Riedel *et al.*, 1995). However, since A_{2A} receptor activation enhances, while A₁ receptors inhibit, the evoked release of ACh in the limbic cortex (Cunha *et al.*, 1994; Rodrigues *et al.*, 2008), it would be expected that blockade of A₁ rather than of A_{2A} receptors might be able to prevent cholinergic hypofunction. Thus, we compared the effects of selectively blocking A_{2A} and A₁ receptors on the impairment of memory caused by scopolamine.

Methods

Animals and housing

Adult male CF1 mice (3–4 months old), obtained from *Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde* (Porto Alegre/RS, Brazil), were housed in standard polypropylene cages (4–5 animals per cage), under a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 h) with food and water *ad libitum*. Independent groups of mice were used for each behavioural test, which were performed between 08:00 h and 14:00 h. All experimental procedures were approved by the ethical committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (Proc. n° 22534) and followed the recommendations of the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals and of the *Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento* (SBNeC). All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath *et al.*, 2010).

Drugs

1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX, a selective A₁R antagonist), 7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine (SCH 58261, a selective A_{2A}R antagonist) and 3-[4-[2-[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(ethylcarbamoyl)-3,4-dihydroxy-oxolan-2-yl]purin-2-yl]amino]ethyl]phenyl]propanoic acid (CGS 21680, an A_{2A}R agonist) were from Tocris (São Paulo/SP, Brazil) and were prepared as 5 mM stock solutions in saline with 20% DMSO and later dissolved to the desired concentration in saline. CGS 21680 was also infused into the lateral ventricles (coordinates: AP –1, LM 1.5 and DV +1.5) in a volume of 1 µL per side. Scopolamine hydrobromide trihydrate, a non-selective muscarinic receptor antagonist, was from Sigma-Aldrich (São Paulo/SP, Brazil), and was dissolved in saline. Drugs were administered i.p. in a volume of 10 mL·kg⁻¹ of body weight at a minimal dose of each drug, with no effects on locomotion (El Yacoubi *et al.*, 2000a,b; Botton *et al.*, 2010).

Behavioural procedures

Different groups of mice were used for each behavioural task. Mice were handled for 2 min for 4 days before beginning the behavioural tasks and transferred to the testing room one hour before the habituation session. The testing room was sound-attenuated room with a low-intensity light (15 lux)

uniformly distributed throughout the arena and a temperature of $21 \pm 2^\circ\text{C}$. The experiments were monitored by two observers blind to experimental protocols and recorded with a video camera positioned above the arena. The data were collected and analysed using the ANY-Maze video-tracking system (Stoelting CO, Woods Dale, IL, USA).

Open field

Mice were exposed to an open-field arena to evaluate locomotor activity and further the object recognition task. The first day corresponded to habituation to the apparatus and the second day to training and test sessions of 90 min. The apparatus was made of black-painted Plexiglas measuring 50×50 cm and was surrounded by 50-cm-high walls. Each mouse was placed in the centre of the arena and the distance travelled, the time and average speed of locomotor activity in metres was recorded for 10 min. The experiments were conducted in a sound-attenuated room under low-intensity light (12 lux); activity was recorded with a video camera positioned above the arena and monitored in an adjacent room by an observer blinded to the treatment of the animals. The open-field apparatus was cleaned after the end of each session.

Novel object recognition task

The object recognition task was carried out in a grey-painted wood open field apparatus ($50 \times 25 \times 25$ cm). For the habituation session, the mice were placed in the open field 24 h before the training session and allowed to explore the arena for 10 min. The training session consisted of allowing the mouse to explore an apparatus containing two similar objects (A and A') for 10 min. The objects were identical sized (13 cm height) glass bottles, but of different shapes and colours, and were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. Each mouse was always placed in the apparatus facing the wall. The tests sessions, after the training, were performed either for 90 min for short-term memory or for 24 h for long-term memory. In the test session, one of the objects was replaced by a novel object and the mice were allowed to explore the objects for 10 min. The apparatus and objects were cleaned with a 70% ethanol solution between trials to eliminate odor cues. The locomotor activity was measured as the total distance travelled, as the percentage of total time engaged in locomotion and as the average speed. To calculate the object discrimination ratio, we first measured the time spent exploring each object, defined as the time a mouse spent directing its nose to the object at a distance ≤ 2 cm and/or touching the object with the nose or forepaws; the discrimination ratio was then expressed as $\text{TN}/(\text{TN} + \text{TF})$ where TF is the time spent exploring familiar object and TN is the time spent exploring the novel object.

Inhibitory avoidance task

The inhibitory avoidance task was assessed in an apparatus consisting of an acrylic box ($30 \text{ cm} \times 25 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$) with a floor containing parallel stainless-steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart and 25 cm platform length on the left. In the training session, animals were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and placed their four paws on the grid, they received a 2 s, 0.5 mA scrambled footshock and were

immediately withdrawn from the training box. The test session was carried out 90 min after the training session (short-term memory) or 24 h after the training session (long-term memory). No footshock was given in the test session, and step-down latencies (180 s ceiling) were taken as a measure of retention.

Modified Y-maze

The Y-maze apparatus consisted of three arms (18 cm long, 6 cm wide and 6 cm high) made of wood covered with impermeable Formica elevated to a height of 50 cm above the floor. We used this task to assess short-term spatial memory, which is based on the innate preference of animals to explore areas that have not been previously explored. This task consisted of two trials (training and test) of 8 min each separated by an intertrial interval of 120 min. During the training trial, one arm (novel) was blocked by a removable door and mice were placed at the end of the one arm (start) facing the centre and they could choose between the start and the 'other' arm. At the end of the training trial, the mouse was removed from the maze and back housing box during the inter-trial interval (120 min). During the test trial, the novel arm was opened and the animals were once again placed at the start arm and allowed to explore freely the three arms for 8 min. The number of entries and the time spent in each arm were recorded. Entry into an arm was defined as placement of all four paws into the arm.

Experimental design

The schedules of administration of drugs and of experimental manipulations are depicted in the timelines displayed in Figure 1.

Experiment 1. Mice received a single i.p. injection of either vehicle (veh – 0.9% saline) or scopolamine (0.1, 0.3 or 1.0 mg·kg⁻¹) 30 min before the training session. The same procedure was performed in another group of animals for DPCPX (0.2, 1.0 or 5.0 mg·kg⁻¹, i.p.) or SCH 58261 (0.1, 0.5 or 1.0 mg·kg⁻¹, i.p.) and for their respective controls (0.9% saline with 20% DMSO). The pharmacokinetic profile of both antagonists shows that they rapidly reach the brain parenchyma where their concentration remains at effective levels for over 120 min (Yang *et al.*, 2007; Elmenhorst *et al.*, 2013). In this experiment, each animal received only one drug in a single dose before the training session.

Experiment 2. Mice first received scopolamine (1.0 mg·kg⁻¹, i.p.) or vehicle 60 min before the training session. After 30 min, the mice received a second injection of vehicle, DPCPX (1.0 mg·kg⁻¹, i.p.) or SCH 58261 (0.5 mg·kg⁻¹, i.p.). The experimental groups were as follows: vehicle (veh + veh), scopolamine (SCO + veh), scopolamine + DPCPX (SCO + DPCPX) and scopolamine + SCH 58261 (SCO + SCH). In order to minimize the number of animals and based on the data from experiment 1, we did not administer DPCPX or SCH 58261 to mice previously injected with vehicle for the novel object recognition task. In the inhibitory avoidance task and modified Y-maze, DPCPX (1.0 mg·kg⁻¹, i.p.) or SCH 58261 (0.5 mg·kg⁻¹, i.p.) were administered with vehicle.

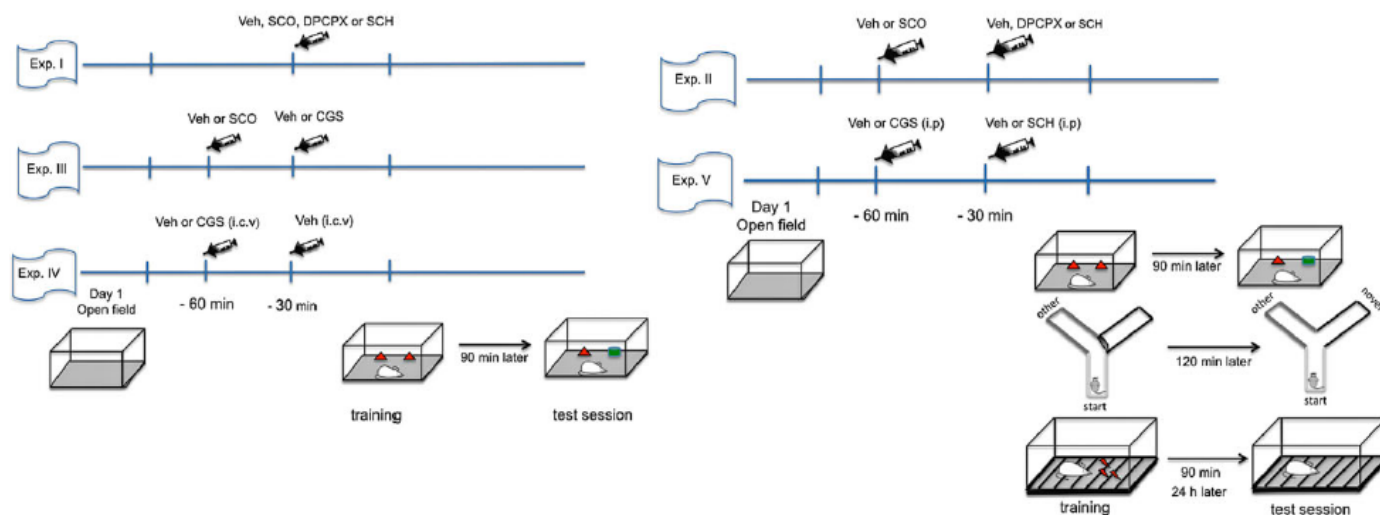


Figure 1

Schematic overview of the experimental design. In all experiments, all groups of mice were submitted to open-field analysis 24 h before the training session. In experiment 1 (Exp. 1), DPCPX (A_1 receptor antagonist, $0.2\text{--}5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) or SCH 58261 (A_{2A} receptor antagonist, $0.1\text{--}1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) or scopolamine (SCO; $0.1\text{--}1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) was administered to different mice 30 min before training of the object recognition task. The test session was performed either 90 min or 24 h after training. In Experiment 2 (Exp. 2), scopolamine ($1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) was administered 30 min before injecting DPCPX ($1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) or SCH 58261 ($0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.). The training session was carried out 30 min after and the test session was performed 90 min for object recognition and inhibitory avoidance tasks, and also 24 h for inhibitory avoidance or 120 min for the modified Y-maze task. In experiment 3 (Exp. 3), scopolamine ($1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) was administered 30 min before injecting the A_{2A} receptor agonist CGS 21680 ($0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.). In experiment 4 (Exp. 4), CGS 21680 (50 nmol) was infused into the lateral ventricles ($1\text{ }\mu\text{L}$ per side) 30 min before training. Test session was performed 90 min after training in the object recognition task. In experiment 5 (Exp. 5), CGS 21680 ($0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) was administered 30 min before SCH 58261 ($0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.). The training session was carried out for 30 min and the test session was performed after 90 min for object recognition task, 90 min and 24 h for inhibitory avoidance task and 120 min for the modified Y-maze task.

Experiment 3. Mice received scopolamine ($1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) or vehicle 60 min before the training session. After 30 min, the mice received a second injection of either vehicle or CGS 21680 ($0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.). We also tested the effects of CGS 21680 ($0.05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.), and the groups in this experiment were vehicle (veh + veh), scopolamine (SCO + veh), CGS 21680 (veh + CGS) and scopolamine + CGS 21680 (SCO + CGS). The test session was performed only 90 min after training.

Experiment 4.

- **Intracerebroventricular infusion:** all surgical procedures were carried out under anaesthesia (ketamine: xylazine – $80:10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.p.) and aseptic conditions. Cannulae (27-gauge) were bilaterally implanted into the lateral ventricles following coordinates: A -1.0 , L ± 1.5 , V -1.5 , from the atlas of Paxinos and Watson. Animals were allowed to recover from surgery for 7 days. Mice received vehicle or CGS (50 nmol , $1\text{ }\mu\text{L}$ per side), 30 min before training. Infusions were carried out over 60 s with an infusion pump and cannulae were left for an additional 60 s to minimize back-flow. The placement of the cannulae was verified *postmortem* 2–4 h after the end of behavioural test by staining with $1\text{ }\mu\text{L}$ of 4% methylene blue solution. Only data from animals with correct implants were analysed (95 %). The test session was performed only 90 min after the training session.

- **Systemic administration:** mice received CGS 21680 ($0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) or vehicle 60 min before the training session. After 30 min, the mice received either vehicle or SCH 58261 ($0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.). The groups in this experiment were vehicle (veh + veh), CGS 21680 (veh + CGS) and CGS 21680 + SCH 58261 (CGS + SCH). In order to minimize the number of animals and based on the results from experiment 2, we did not administer SCH 58261 to mice previously injected with vehicle. The test session was performed only 90 min after the training session.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Two-way ANOVA was used to analyse the discrimination ratio with repeated measures (within-subject factor: sessions of behavioural test; between-subject factor: treatments) followed by a Tukey’s multiple comparisons test. In some cases, Student’s paired *t*-test was also used to analyse differences between training and test sessions within the same group. The locomotor activity and modified Y-maze task was analysed by one-way ANOVA followed by either a Tukey’s multiple comparisons test or a Kruskal–Wallis test and a Dunn’s multiple comparisons procedure. Data from inhibitory avoidance task are presented as median values (interquartile range) and analysed by Wilcoxon paired test for differences within groups (training vs. test sessions) and Mann–Whitney test for differences between groups. GraphPad Prism 6 software (São Paulo/SP, Brazil) was

used for statistical analysis and significance was considered as $P < 0.05$.

Results

Experiment 1

No differences were found in either the total distance travelled or the time engaged in locomotion or the average speed for each dose of DPCPX (Table 1), SCH 58261 (Table 2) or scopolamine tested (Table 3), when administered 30 min

before the training session, in the object recognition task. The administration of DPCPX [$F_{(3,45)} = 2.150$; $P = 0.1071$] or SCH 58261 [$F_{(3,72)} = 1.429$; $P = 0.2413$] did not alter the discrimination ratio. In fact, all groups of mice were equally able to discriminate the novel from the familiar object with all doses of either DPCPX [$F_{(2,90)} = 42.33$; $P < 0.0001$] or SCH 58261 [$F_{(2,144)} = 26.39$; $P < 0.0001$] (Figure 2A and 2B respectively).

The highest dose of scopolamine tested, administered 30 min before the training session, impaired recognition memory. Thus, two-way ANOVA with repeated measures revealed differences between sessions [$F_{(2,84)} = 25.05$;

Table 1

Locomotor activity during the training session of object recognition task for different doses of DPCPX

	0.0 mg·kg ⁻¹		0.2 mg·kg ⁻¹		1.0 mg·kg ⁻¹		5.0 mg·kg ⁻¹		F value	P value
	M	SEM	M	SEM	M	SEM	M	SEM		
Distance travelled (m)	34.77	1.95	36.34	2.15	34.49	1.60	31.92	2.58	0.764	0.520
Time of locomotor activity (s)	489.3	7.18	486.6	10.87	500.7	8.59	443.2	25.23	3.103 ^a	0.376
Average speed of locomotion (m·min ⁻¹)	4.25	0.21	4.48	0.25	4.14	0.20	4.31	0.21	0.435	0.29

Results from 12 to 13 animals per group.

Statistical analysis performed by one-way ANOVA or ^aKruskal–Wallis test.

No significant differences.

M, mean.

Table 2

Locomotor activity during the training session of object recognition task for different doses of SCH58261

	0.0 mg·kg ⁻¹		0.1 mg·kg ⁻¹		0.5 mg·kg ⁻¹		1.0 mg·kg ⁻¹		KW value	P value
	M	SEM	M	SEM	M	SEM	M	SEM		
Distance travelled (m)	27.76	0.85	30.56	2.74	29.03	0.77	29.02	1.09	1.427	0.699
Time of locomotor activity (s)	485.6	6.52	488.2	14.50	501.8	6.56	508.5	7.61	4.024	0.259
Average speed of locomotion (m·min ⁻¹)	3.43	0.09	3.64	0.24	3.47	0.07	3.41	0.08	0.642	0.887

Results from 16 to 24 animals per group.

Statistical analysis performed by Kruskal–Wallis test.

M, mean.

Table 3

Locomotor activity during the training session of object recognition task for different doses of scopolamine

	0.0 mg·kg ⁻¹		0.1 mg·kg ⁻¹		0.3 mg·kg ⁻¹		1.0 mg·kg ⁻¹		KW value	P value
	M	SEM	M	SEM	M	SEM	M	SEM		
Distance travelled (m)	34.98	1.77	33.45	2.94	36.08	1.13	38.71	1.41	5.212	0.157
Time of locomotor activity (s)	451.3	25.80	455.6	24.41	481.7	12.36	471.2	8.78	2.352	0.503
Average speed of locomotion (m·min ⁻¹)	4.82	0.47	4.36	0.26	4.39	0.18	4.61	0.16	2.150	0.542

Results from 10 to 12 animals per group.

Statistical analysis performed by Kruskal–Wallis test.

M, mean.

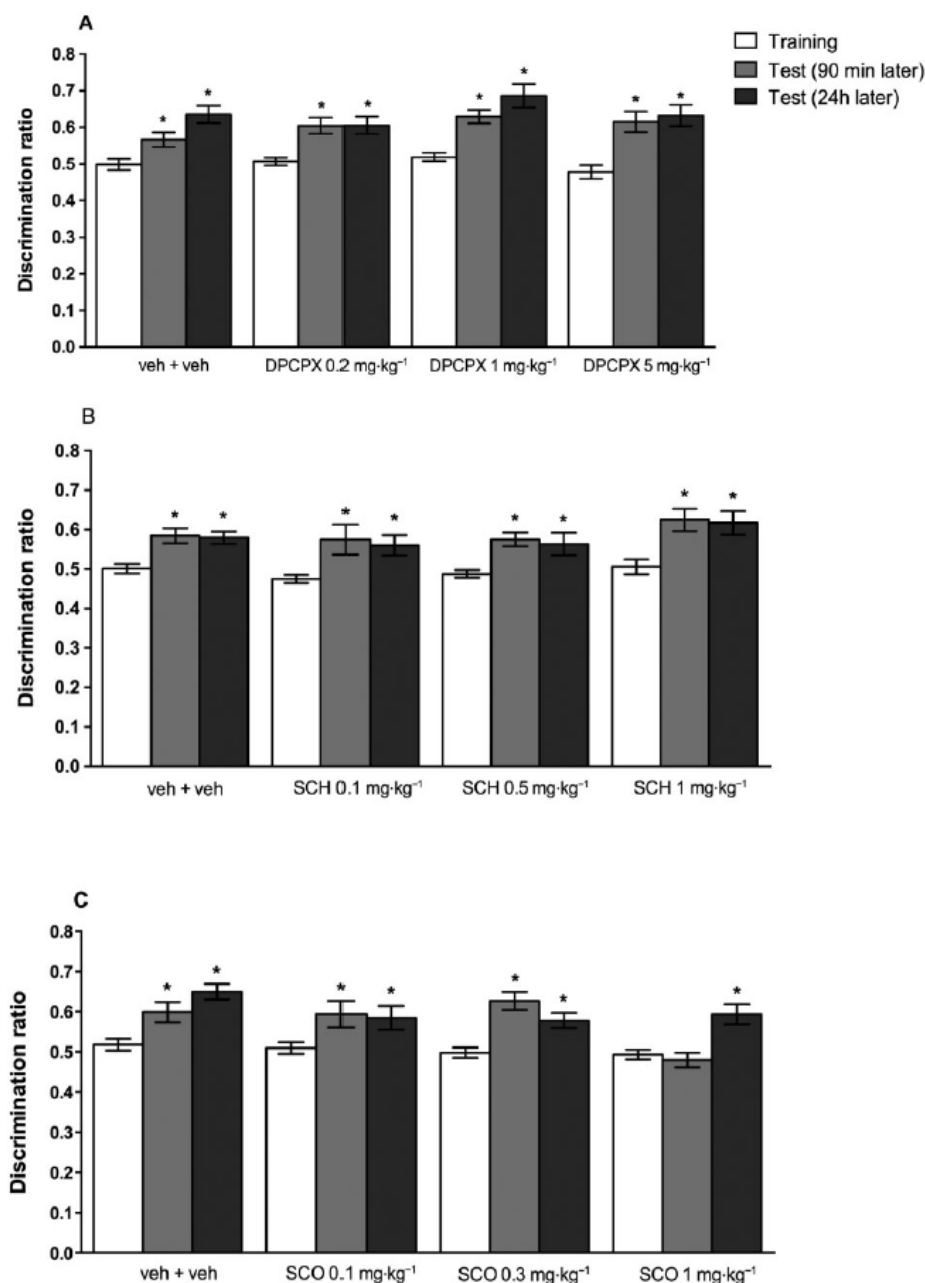


Figure 2

Dose-dependent effects of the adenosine receptor antagonists and of scopolamine (SCO) in the object recognition task (experiment 1). (A) The selective blockade of A₁ receptors by i.p. administration of DPCPX 30 min before the training session did not modify the discrimination ratio. Results are means ± SEM of *n* = 12–13 mice per group; **P* < 0.05 versus training session. (B) The selective blockade of A_{2A} receptors by administration of SCH 58261 (SCH, i.p.) 30 min before the training session did not modify the discrimination ratio. Results are mean ± SEM of *n* = 16–20 mice per group; **P* < 0.05 versus training session. (C) The blockade of muscarinic receptors by SCO (i.p.) 30 min before the training session only decreased the discrimination ratio at the highest tested dose and when testing was carried out 90 min after training. Results are means ± SEM of *n* = 10–12 mice per group; **P* < 0.05 versus training session.

P < 0.0001], doses [*F*_(3,42) = 3.736; *P* = 0.0182] and interaction between sessions and doses [*F*_(6,84) = 4.006; *P* = 0.0014]. Mice that received vehicle and scopolamine at 0.1 and 0.3 mg·kg⁻¹ were still able to discriminate the novel from the familiar object in both test sessions, whereas the administration of scopolamine (1.0 mg·kg⁻¹) impaired recognition memory when assessed 90 min after training, but not 24 h later (Figure 2C). Thus, all subsequent experiments focused only

on short-term memory, with the test session performed 90 min after the training session, since this was the condition most sensitive to scopolamine.

Experiment 2

The role of A₁ or A_{2A} receptors in the scopolamine-induced memory impairment was evaluated by testing the effects of either the A₁ receptor antagonist DPCPX (1.0 mg·kg⁻¹) or of

Table 4

Locomotor activity during the training session of object recognition task for experiment 2

	veh + veh		Scop + veh		Scop + DPCPX		Scop + SCH58261		F value	P value
	M	SEM	M	SEM	M	SEM	M	SEM		
Distance travelled (m)	35.83	2.84	36.76	3.22	33.44	2.42	32.89	2.45	2.823 ^a	0.4198
Time of locomotor activity (s)	482.1	12.20	487.5	37.13	484.9	18.57	476.9	16.98	2.724 ^a	0.4361
Average speed of locomotion (m·min ⁻¹)	4.44	0.31	4.48	0.21	4.15	0.29	4.11	0.22	0.535	0.6610

Results from 11 animals per group.

One-way ANOVA or ^aKruskal–Wallis test.

No significant differences.

M, mean; Scop, scopolamine; veh, vehicle.

the A_{2A} receptor antagonist SCH 58261 (0.5 mg·kg⁻¹), administered 30 min after scopolamine (1.0 mg·kg⁻¹), in the different memory tests. Neither DPCPX nor SCH 58261 without or with scopolamine affected locomotor activity (Table 4). By contrast, both adenosine receptor antagonists altered the effect of scopolamine on recognition memory. Two-way ANOVA with repeated measures revealed differences between sessions [$F_{(1,40)} = 51.69$; $P < 0.0001$], treatments [$F_{(3,40)} = 3.842$; $P = 0.0165$] and an interaction between sessions and treatments [$F_{(3,40)} = 3.139$; $P = 0.0357$]. Mice that received scopolamine (1.0 mg·kg⁻¹) 60 min before training (scopolamine + veh) were not able to discriminate the novel from the familiar object. However, mice that received the A₁ receptor antagonist DPCPX (1.0 mg·kg⁻¹) or the A_{2A} receptor antagonist SCH 58261 (0.5 mg·kg⁻¹) 30 min after the scopolamine injection (SCO + DPCPX or SCO + SCH groups, respectively) were able to discriminate the objects (Figure 3A). In the inhibitory avoidance task, all groups presented differences between training and test sessions ($P < 0.05$), except mice treated with scopolamine ($P > 0.05$). However, the A₁ receptor antagonist DPCPX seemed more effective than the A_{2A} receptor antagonist at preventing the memory impairment caused by scopolamine (Figure 3B). The adenosine receptor antagonists had a different effect on the scopolamine-impaired memory performance in the modified Y-maze. Analysis of the percentage of exploration in three arms revealed that mice treated with vehicle spent more time exploring the novel arm compared with the other arms [$F_{(2,18)} = 18.61$; $P < 0.0001$] (Figure 3C). By contrast, mice treated with scopolamine did not show any differences ($P > 0.05$) in the time spent searching the different arms (Figure 3C). Notably, scopolamine-treated mice that received the A_{2A} receptor antagonist (SCO + SCH group) displayed again differences in the exploration of new arm when compared with the others [$F_{(2,21)} = 3.788$; $P = 0.0394$], whereas the SCO + DPCPX group still displayed no differences in the percentage of exploration of the different arms ($P > 0.05$) (Figure 3C). Finally, the antagonists were devoid of effects by themselves since both the SCH + veh [$F_{(2,15)} = 24.65$; $P < 0.0001$] and the DPCPX + veh [$F_{(2,15)} = 10.10$; $P = 0.0017$] groups spent more time searching the novel arm compared with the others.

Experiment 3

We then investigated if the activation of A_{2A} receptors further accentuates scopolamine-induced impairment of recognition memory. Thus, we administered the A_{2A} receptor agonist CGS 21680 (0.1 mg·kg⁻¹) or vehicle 30 min after scopolamine (1.0 mg·kg⁻¹), which was injected 60 min before training. CGS 21680 did not affect locomotor activity alone or when administered with scopolamine (Table 5). This contrasted with the decreased locomotion observed with CPA (0.3–1.0 mg·kg⁻¹; El Yacoubi *et al.*, 2000b), which precluded testing the effect of A₁ receptor activation on the scopolamine-induced depression of recognition memory. The analysis of the effect of CGS 26180 showed that it did not significantly exacerbate the scopolamine-induced memory impairment, probably because it already caused memory impairment by itself: in fact, control mice (veh + veh group) were able to discriminate the novel from the familiar object and this was the only group displaying a significant difference between the training and test session (paired *t*-test, $t = 5.729$; $P = 0.0004$). In all other groups (SCO + veh, veh + CGS and SCO + CGS), no differences were found between sessions, suggesting that these mice were not able to discriminate the novel from the familiar object (Figure 4).

Experiment 4

In order to rule out peripheral effects of CGS 21680 as a cause for the memory impairment observed in the object recognition task, and in attempt to ensure that the effect found is predominantly central, CGS 21680 was directly infused into the lateral ventricles. As shown in Figure 5, the infusion of CGS 21680 (50 nmol) directly into the ventricles 30 min before training abolished recognition memory (Student's paired *t*-test, $t = 0.01216$; $P = 0.9906$; Figure 5).

Experiment 5

We next tested if the activation of A_{2A} receptors was sufficient to impair other types of short-term memory, beyond recognition memory, in control mice. Thus, we investigated if CGS 21680 (0.1 mg·kg⁻¹) would impair aversive and spatial memory and if the blockade of A_{2A} receptors with SCH 58261

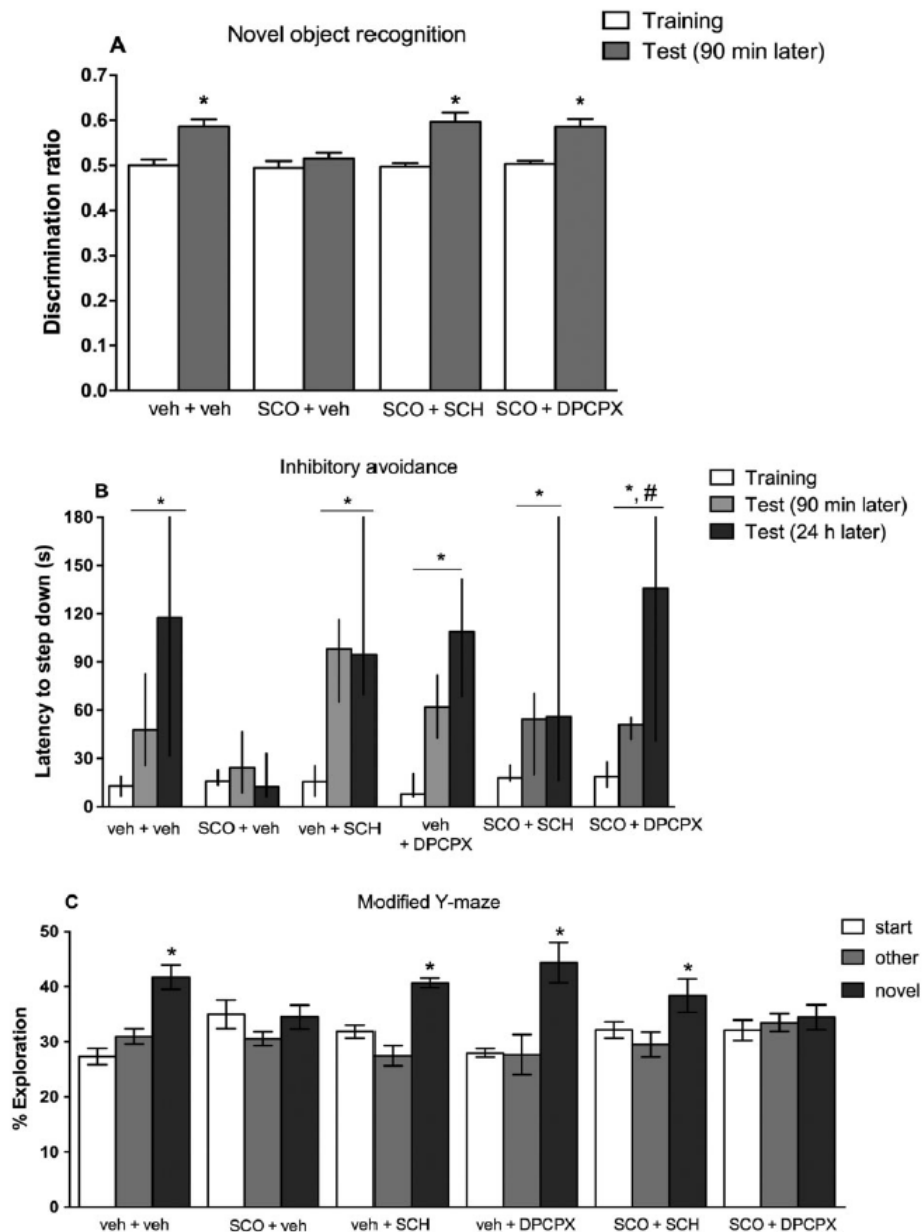


Figure 3

The selective blockade of either A_1 or A_{2A} receptors prevented the scopolamine (SCO)-induced impairment in short-term memory (experiment 2). DPCPX (A_1 receptor antagonist, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) or SCH 58261 (SCH, A_{2A} receptor antagonist, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) were administered 30 min after SCO ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.), which was injected 60 min before training in three different tests, namely (A) discrimination ratio for object recognition task; data are mean \pm SEM of $n = 10\text{--}11$ mice per group; $*P < 0.05$ versus training session. (B) Latencies in seconds (s) to step down from the platform in the inhibitory avoidance task; data are median and interquartile range of $n = 6\text{--}10$ mice per group; $*P < 0.05$, Wilcoxon paired t -test comparing training and test session within group; $\#P < 0.05$, Mann-Whitney test comparing the groups SCO + veh and SCO + DPCPX in the test sessions; (C) percentage of the time of exploration in the three arms (start, other and novel) in the test trial of the modified Y-maze task; data are means \pm SEM of $n = 6\text{--}9$ mice per group; $*P < 0.05$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test comparing the novel and other arms (start and other) within group. The tested groups were: veh + veh (vehicle); SCO + veh (SCO); DPCPX + veh (DPCPX) SCH + veh (SCH 58261); SCO + DPCPX (SCO + DPCPX) and SCO + SCH (SCO + SCH 58261).

($0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) would prevent the CGS 21680-induced memory impairment in the three tasks. Neither CGS 21680 nor SCH 58261 alone or in combination modified locomotor activity (Table 6). In contrast to control mice (veh + veh group),

which recognized the novel from the familiar object as concluded from the differences between the training and test sessions (paired t -test, $t = 7.859$, $P < 0.0001$), the administration of CGS 21680 ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 60 min before the training

Table 5

Locomotor activity during the training session of object recognition task for experiment 3

	veh + veh		SCO + veh		veh + CGS21680		SCO + CGS21680		F value	P value
	M	SEM	M	SEM	M	SEM	M	SEM		
Distance travelled (m)	38.00	2.594	36.97	2.771	39.34	1.315	35.20	1.398	2.405 ^a	0.4927
Time of locomotor activity (s)	407.1	28.99	380.9	22.13	428.4	23.00	375.8	30.52	0.7127	0.5499
Average speed of locomotion (m·min ⁻¹)	5.922	0.7482	6.128	0.6264	5.702	0.5255	6.059	0.5923	0.0104 ^a	0.9997

Results from 8 to 16 animals per group.

One-way ANOVA or ^aKruskal–Wallis.

No significant differences.

M, mean; Scop, scopolamine; veh, vehicle.

Table 6

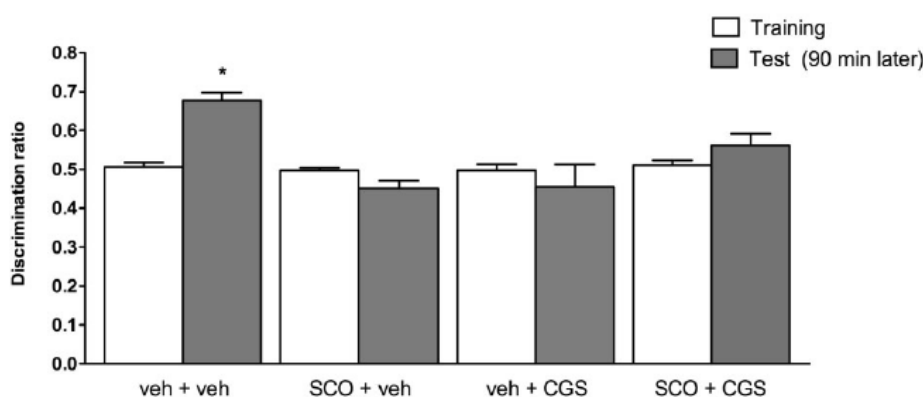
Locomotor activity during the training session of object recognition task for experiment 4

	veh + veh		CGS21680 + veh		CGS21680 + SCH58261		F value	P value
	M	SEM	M	SEM	M	SEM		
Distance travelled (m)	33.06	3.182	35.12	3.640	31.88	2.891	0.2302	0.7961
Time of locomotor activity (s)	398.9	24.37	394.0	25.43	393.4	10.11	0.0524 ^a	0.9741
Average speed of locomotion (m·min ⁻¹)	5.097	0.5375	5.628	0.7866	4.937	0.3934	0.3672	0.6962

One-way ANOVA (or Kruskal–Wallis). Results from 8 to 11 animals per group.

^aKruskal–Wallis test was used.

M, mean; veh, vehicle.

**Figure 4**

The activation of adenosine A_{2A} receptors did not exacerbate the scopolamine (SCO)-induced impairment of the discrimination ratio in the recognition memory test (experiment 3). The adenosine A_{2A} receptor agonist CGS 21680 (0.1 mg·kg⁻¹) was administered i.p. 30 min before SCO (1.0 mg·kg⁻¹, i.p.), which was injected 60 min before training. Data are means ± SEM of *n* = 9–16 mice per group; **P* < 0.05 versus training session.

session (CGS + veh group) impaired recognition memory, as evidenced by the lack of difference between training and test session (*P* > 0.05). Mice that received SCH 58261 (0.5 mg·kg⁻¹) 30 min after CGS 21680 (0.1 mg·kg⁻¹; SCH +

CGS group) were again able to discriminate the novel from the familiar object, as judged by the difference between the training and test sessions (paired *t*-test, *t* = 2.715, *P* = 0.0264; Figure 6A).

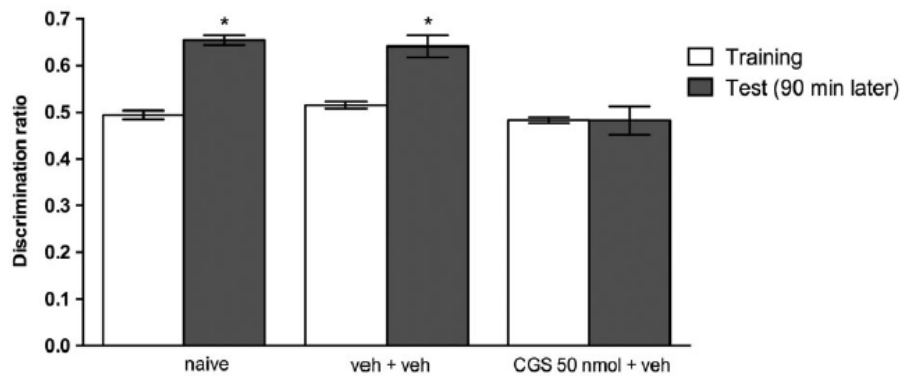


Figure 5

The i.c.v. infusion of CGS 21680 impaired the discrimination ratio in the recognition memory test (experiment 4). The adenosine A_{2A} receptor agonist CGS 21680 (50 nmol, 1 μ L per side) was infused into lateral ventricles 30 min before training. Test session was carried out 90 min later. Naïve ($n = 5$); veh + veh (vehicle, $n = 8$) and CGS + veh (CGS 21680, $n = 8$). Data are means \pm SEM * $P < 0.05$ versus training session.

In the inhibitory avoidance test, all groups of mice presented differences between training and both test sessions (90 min or 24 h after training; $P < 0.05$). However, CGS 21680 (0.1 mg·kg⁻¹) worsened the long-term memory performance, as testified by the different latencies measured in the test session between CGS + veh and veh + veh groups ($P < 0.05$). The selective blockade of A_{2A} receptors effectively prevented the CGS 21680-induced mnemonic deficit, as gauged by the different latencies measured in the test session between the CGS + veh and CGS + SCH groups ($P < 0.05$; Figure 6B).

In the modified Y-maze, it was observed that mice treated only with 0.1 mg·kg⁻¹ CGS 21680 (CGS + veh) were the only group that did not show differences in the exploration of the novel arm when compared with the others arms [$F_{(2,18)} = 1.240$; $P = 0.3129$], whereas both control mice (veh + veh) [$F_{(2,21)} = 36.75$; $P < 0.0001$] and mice treated with the A_{2A} receptor antagonist, SCH 58261 before CGS 21680 (CGS + SCH) [$F_{(2,21)} = 3.890$; $P = 0.0385$] spent more time exploring the novel arm than the others (Figure 6C).

Discussion

The present study shows that the selective blockade of A_{2A} receptors reproducibly prevented the scopolamine-induced impairment in short-term memory in three different behavioural tasks, which was also prevented by the A_1 receptor antagonist in most tasks. This implies that the previously observed beneficial effect of caffeine to prevent scopolamine-induced amnesia (Botton *et al.*, 2010) probably results from its dual ability to antagonize A_1 and A_{2A} receptors (Fredholm *et al.*, 1999). Furthermore, we now showed that the activation of A_{2A} receptors in naïve animals is sufficient to disrupt short-term memory in the three different tests, an effect mimicked by the direct brain activation of A_{2A} receptors. Therefore, we now provide the first integrated evidence that activation of A_{2A} receptors is necessary and sufficient for the impairment of short-term memory.

By using selective antagonists of A_1 and A_{2A} receptors that are devoid of effects in anxiety-related tests (El Yacoubi

et al., 2000a,b) and by controlling for their lack of effect on spontaneous locomotion, we can now conclude that the blockade of A_{2A} receptors prevents scopolamine-induced deficits in short-term recognition memory in three different behavioural paradigms. Notably, the selective blockade of A_1 receptors also attenuated the scopolamine-induced deficits in short-term recognition memory in the object recognition test and in the inhibitory avoidance test, but not in the modified Y-maze, which is the test with the lowest sensory or aversive influence. Since we have previously shown that such deficits in recognition memory are also attenuated by caffeine (Botton *et al.*, 2010), which is a mixed A_1 and A_{2A} receptor antagonist at non-toxic doses (Fredholm *et al.*, 1999), we can tentatively conclude that this prevention by caffeine of scopolamine-induced amnesia is likely to depend on both A_1 and A_{2A} receptors. This provides a conclusion different from that previously derived from the comparison of the effects of caffeine and of A_1 and A_{2A} receptors on memory impairment in different animal models of brain disease (see Cunha and Agostinho, 2010). In fact, in animal models of aging (Prediger *et al.*, 2005), AD (Dall'igna *et al.*, 2007), attention deficit and hyperactivity disorder (Pandolfo *et al.*, 2013), early life convulsions (Cognato *et al.*, 2010) or early life stress (Batalha *et al.*, 2013), the ability of caffeine to prevent memory dysfunction is mimicked by the selective blockade of A_{2A} , but not of A_1 receptors.

Our results imply that A_1 receptors are selectively involved in this model of scopolamine-induced amnesia, in particular in tasks relying on sensory or nociceptive components (see also Suzuki *et al.*, 1993). This is in agreement with the particular importance of A_1 receptors to control the cholinergic system, which is expected to be at the core of the scopolamine-induced amnesia: in fact, A_1 receptors control the actions of muscarinic receptors (Pedata *et al.*, 1986; Oliveira *et al.*, 2002) and efficiently inhibit the release of ACh in the limbic cortex (e.g. Jackisch *et al.*, 1984; Cunha *et al.*, 1994). Accordingly, A_1 receptor antagonists can bolster the release of ACh (Pedata *et al.*, 1986; Cunha *et al.*, 1994), potentially counteracting the scopolamine-induced cholinergic

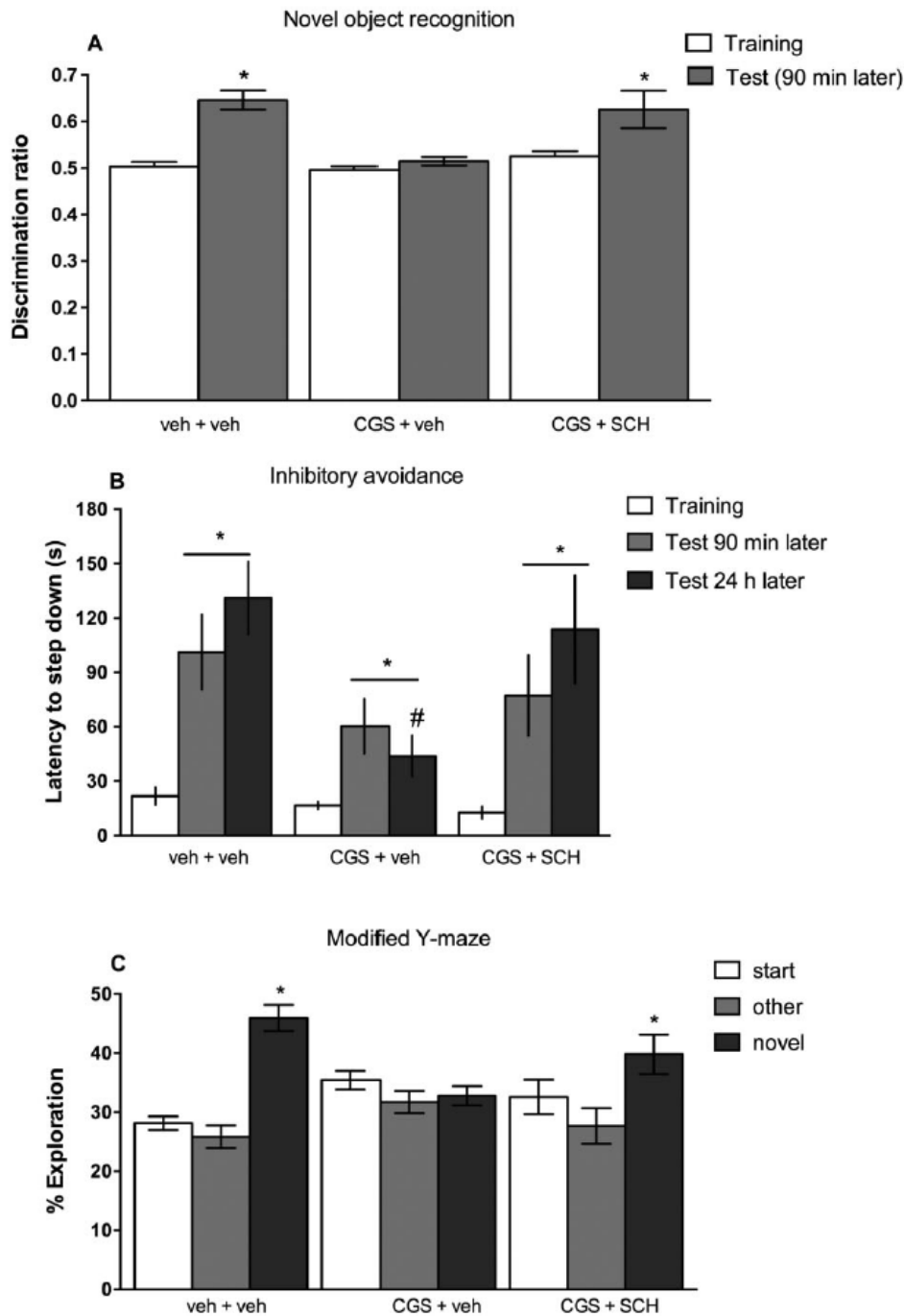


Figure 6

The blockade of adenosine A_{2A} receptors prevents the deterioration in short-term memory triggered by exposure to CGS 21680 (experiment 5). CGS 21680 (0.1 mg·kg⁻¹, i.p.) was administered 30 min before SCH 58261 (0.5 mg·kg⁻¹, i.p.), which was administered 30 min before training. CGS 21680 impaired: (A) the discrimination ratio in the recognition memory test (data are means ± SEM of *n* = 9–10 mice per group; **P* < 0.05 vs. training session); (B) the latency in seconds (s) to step down in the inhibitory avoidance task (data are median and interquartile range of *n* = 6–8 mice per group; **P* < 0.05, Wilcoxon paired *t*-test comparing training and test session within group; #*P* < 0.05, Mann–Whitney test comparing veh + veh and CGS + SCH group in the test sessions); (C) the percentage of the time of exploration in the three arms (start, other and novel) in the test trial of the modified Y-maze task. Data are means ± SEM of *n* = 7–8 mice per group; **P* < 0.05 one-way ANOVA and Tukey’s multiple comparison test comparing the novel and other arms within group.

hypofunction that underlies memory deficits (reviewed in Fisher, 2012).

In contrast, A_{2A} receptor antagonists inhibit the release of ACh from limbic cortical preparations (Rodrigues *et al.*,

2008), an effect that is not compatible with the beneficial effect of A_{2A} receptor antagonists to alleviate memory impairment; furthermore, other central responses triggered by the activation of muscarinic receptors, such as rapid eye

movement sleep (Marks *et al.*, 2003) or tremor (Salamone *et al.*, 2013), are prevented by A_{2A} receptor antagonists. Thus, it is most likely that the beneficial effect of A_{2A} receptor antagonists found in the present study may not result from a direct effect on the cholinergic system but might instead be related to their ability to control synaptic plasticity in cortical circuits (Rebola *et al.*, 2008; Costenla *et al.*, 2011), which is argued to be the neurophysiological basis of learning and memory (Martin *et al.*, 2000). This would explain the general ability of A_{2A} receptor antagonists to prevent memory impairment under different conditions, including upon exposure to scopolamine as now reported, especially since scopolamine might decrease LTP in slices from the hippocampus or perirhinal cortex (e.g. Hirotsu *et al.*, 1989; Warburton *et al.*, 2003; but see Tanaka *et al.*, 1989). Thus, the effect of A_{2A} receptor antagonists would be a balance between its beneficial effect normalizing synaptic plasticity and its detrimental effects on the cholinergic system. Furthermore, this hypothesis might explain a previous report using different doses of scopolamine and A_{2A} receptor antagonists that concluded that the blockade of A_{2A} receptors was not completely effective at preventing the impairment of spatial memory induced by scopolamine (Cunha *et al.*, 2008).

However, it is important to stress that the mechanism(s) underlying this beneficial effect of A_{2A} and A_1 receptor antagonists on scopolamine-induced amnesia are currently difficult to unravel. One of the reasons is essentially because the neurophysiological bases of scopolamine-induced amnesia are still unclear given that the effects of scopolamine on synaptic plasticity are not consistently observed (e.g. Hirotsu *et al.*, 1989; Warburton *et al.*, 2003; but see Tanaka *et al.*, 1989). Besides, scopolamine actually bolsters ACh release in a manner mimicked by muscarinic M_1 receptor antagonists (Vannucchi *et al.*, 1997), in contrast to the beneficial effect of muscarinic M_1 receptor agonists and acetylcholinesterase inhibitors to alleviate memory impairment (reviewed in Fisher, 2012). Furthermore, it has been observed that an injection of scopolamine into the perirhinal cortex can actually improve object recognition memory (Winters *et al.*, 2007), which argues for the involvement of circuit-mediated effects (i.e. affecting different brain regions and their connectivity) in the amnesia induced by systemic administration of scopolamine rather than single neurochemical events (i.e. restricted to a single molecular alteration in a defined brain region).

In contrast to the effectiveness of A_{2A} receptors at controlling memory dysfunction under different brain conditions, we observed that neither A_{2A} nor A_1 receptor antagonists modified recognition memory in control mice that were not challenged with scopolamine. The effect of A_1 receptor blockade on memory performance is rather controversial, with reports of beneficial (Pereira *et al.*, 2002; Mioranza *et al.*, 2011; Harvey *et al.*, 2012) and detrimental or lack of effects (Kopf *et al.*, 1999; Giménez-Llort *et al.*, 2002; Vollert *et al.*, 2013), probably depending on the schedule of administration of the A_1 receptor antagonists and on the different dependence of the memory task on anxiety and locomotion, since the activation of A_1 receptors can cause a profound sedative effect (Snyder *et al.*, 1981; Bruns *et al.*, 1983).

As for the effect of A_{2A} receptor blockade on control rodents, a similar lack of effect of A_{2A} receptor antagonists on

memory function of naïve adult animals was also reported in previous studies (Prediger *et al.*, 2005; Dall'Igna *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2008; Canas *et al.*, 2009; Cognato *et al.*, 2010; Batalha *et al.*, 2013). This is confirmed in transgenic mice with A_{2A} receptor deletion, which display an unaltered reference memory (Canas *et al.*, 2009; Augusto *et al.*, 2013; but see Wang *et al.*, 2006) and an enhanced working memory performance (Zhou *et al.*, 2009; Augusto *et al.*, 2013). Thus, it seems that A_{2A} receptors are selectively engaged upon perturbation of brain function to control recognition memory and become the preferential target for the benefits of caffeine in promoting neuroprotection against the mnemonic deficits observed in experimental models of AD and aging (Prediger *et al.*, 2005; Arendash *et al.*, 2006; Dall'Igna *et al.*, 2007; Canas *et al.*, 2009; Espinosa *et al.*, 2013).

Notably, in the present study we observed that the activation of A_{2A} receptors in control mice was sufficient to trigger a memory deficit, that is, CGS 21680 attenuated short-term memory in all three behavioural tests, an effect prevented by SCH 58261. Furthermore, infusion of CGS 21680 i.c.v. mimicked the impairment in recognition memory caused by its systemic administration. CGS 21680 infused directly into the posterior cingulate cortex has previously been demonstrated to worsen memory retrieval in the inhibitory avoidance task (Pereira *et al.*, 2005). Similar deficits in memory performance in the object recognition task were observed in transgenic rats overexpressing A_{2A} receptors in the forebrain (Giménez-Llort *et al.*, 2007) and an up-regulation of limbic cortical A_{2A} receptors is observed upon memory impairment in patients (Albasanz *et al.*, 2008) and in animal models of brain disease (Cognato *et al.*, 2010; Espinosa *et al.*, 2013). Finally, we also observed that CGS 21680 did not further exacerbate the scopolamine-induced impairment in recognition memory, as this effect probably results from the full engagement of A_{2A} receptors. This body of evidence not only indicates that the activation of A_{2A} receptors is detrimental for memory performance but also prompts the hypothesis that the over-activation of A_{2A} receptors may actually be a cause of memory impairment. This makes the elucidation of the signalling mechanism operated by A_{2A} receptors particularly important (Fredholm *et al.*, 2007; Zezula and Freissmuth, 2008), as this may shed light on transducing systems critically associated with the implementation and recall of memory traits.

In conclusion, the present study establishes the involvement of both A_1 and A_{2A} receptor antagonism as likely mechanisms underlying the beneficial effect of caffeine on scopolamine-induced deficits in recognition memory. Furthermore, the present observation that A_{2A} receptor activation is sufficient to trigger memory deficits prompts the hypothesis that an over-activation of A_{2A} receptors might actually be a causative factor for the emergence of memory deficits. Overall, these results reinforce the therapeutic interest in targeting A_{2A} receptors to manage memory dysfunction.

Acknowledgements

We are grateful to CNPq and CAPES for fellowships. Giovanna C. Chenet received a fellowship from PROBIC/FAPERGS. A. S. A. and D. M. M. are fellows from CNPq and

FAPERGS. This study was supported by PRONEX, PRONEM (FAPERGS/CNPq), FCT/CAPES and *Ciência sem Fronteiras*.

Author contributions

N. P., A. S. A., D. M. M., P. H. S. B., S. M., F. N., G. C. C. and C. M. L. performed the experiments and help to analyse the data. N. P., R. A. C. and L. O. P. designed the research study. N. P., R. A. C. and L. O. P. analysed the data and wrote the paper.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Albasanz JL, Perez S, Barrachina M, Ferrer I, Martín M (2008). Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 18: 211–219.
- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M *et al.* (2013). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 170: 1459–1581.
- Angelucci ME, Vital MA, Cesário C, Zadusky CR, Rosalen PL, Da Cunha C (1999). The effect of caffeine in animal models of learning and memory. *Eur J Pharmacol* 373: 135–140.
- Arendash GW, Schleif W, Rezaei-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR *et al.* (2006). Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* 142: 941–952.
- Augusto E, Matos M, Sévigny J, El-Tayeb A, Bynoe MS, Müller CE *et al.* (2013). Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated formation of adenosine is critical for the striatal adenosine A_{2A} receptor functions. *J Neurosci* 33: 11390–11399.
- Bartus RT (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 163: 495–529.
- Batalha VL, Pego JM, Fontinha BM, Costenla AR, Valadas JS, Baqi Y *et al.* (2013). Adenosine A_{2A} receptor blockade reverts hippocampal stress-induced deficits and restores corticosterone circadian oscillation. *Mol Psychiatry* 18: 320–331.
- Borota D, Murray E, Keceli G, Chang A, Watabe JM, Ly M *et al.* (2014). Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. *Nat Neurosci* 17: 201–203.
- Botton PH, Costa MS, Ardais AP, Mioranzza S, Souza DO, da Rocha JB *et al.* (2010). Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behav Brain Res* 214: 254–259.
- Bruns RF, Katims JJ, Annau Z, Snyder SH, Daly JW (1983). Adenosine receptor interactions and anxiolytics. *Neuropharmacology* 22: 1523–1529.
- Canas PM, Porciúncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM *et al.* (2009). Adenosine A_{2A} receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 29: 14741–14751.
- Cao C, Loewenstein DA, Lin X, Zhang C, Wang L, Duara R *et al.* (2012). High Blood caffeine levels in MCI linked to lack of progression to dementia. *J Alzheimers Dis* 30: 559–572.
- Chen JF, Eltzhig HK, Fredholm BB (2013). Adenosine receptors as drug targets – what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* 12: 265–286.
- Cognato GP, Agostinho PM, Hockemeyer J, Müller CE, Souza DO, Cunha RA (2010). Caffeine and an adenosine A(2A) receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. *J Neurochem* 112: 453–462.
- Costa MS, Botton PH, Mioranzza S, Ardais AP, Moreira JD, Souza DO *et al.* (2008). Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immuncontent in the hippocampus. *Neurochem Int* 53: 89–94.
- Costenla AR, Diógenes MJ, Canas PM, Rodrigues RJ, Nogueira C, Maroco J *et al.* (2011). Enhanced role of adenosine A_{2A} receptors in the modulation of LTP in the rat hippocampus upon ageing. *Eur J Neurosci* 34: 12–21.
- Cunha GM, Canas PM, Melo CS, Hockemeyer J, Müller CE, Oliveira CR *et al.* (2008). Adenosine A_{2A} receptor blockade prevents memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Exp Neurol* 210: 776–781.
- Cunha RA (2008). Different cellular sources and different roles of adenosine: A₁ receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A_{2A} receptor-mediated facilitation of plasticity. *Neurochem Int* 52: 65–72.
- Cunha RA, Agostinho PM (2010). Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J Alzheimers Dis* 20 (Suppl. 1): S95–S116.
- Cunha RA, Milusheva E, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastião AM (1994). Excitatory and inhibitory effects of A₁ and A_{2A} adenosine receptor activation on the electrically evoked [³H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. *J Neurochem* 63: 207–214.
- Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR (2007). Caffeine and adenosine A_{2A} receptor antagonists prevent beta-amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol* 203: 241–245.
- El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois J (2000a). SCH 58261 and ZM 241385 differentially prevent the motor effects of CGS 21680 in mice: evidence for a functional 'atypical' adenosine A_{2A} receptor. *Eur J Pharmacol* 401: 63–77.
- El Yacoubi M, Ledent C, Ménard JF, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM (2000b). The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A_{2A} receptors. *Br J Pharmacol* 129: 1465–1473.
- Elmenhorst D, Kroll T, Wedekind F, Weisshaupt A, Beer S, Bauer A (2013). In vivo kinetic and steady-state quantification of [¹⁸F]-CPFPX binding to rat cerebral A₁ adenosine receptors: validation by displacement and autoradiographic experiments. *J Nucl Med* 54: 1411–1419.
- Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M (2009). Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *J Alzheimers Dis* 16: 85–91.

- Espinosa J, Rocha A, Nunes F, Costa MS, Schein V, Kazlauckas V *et al.* (2013). Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A_{2A} receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. *J Alzheimers Dis* 34: 509–518.
- Fisher A (2012). Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 120 (Suppl. 1): 22–33.
- Fredholm BB, Bättig K, Holmén 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, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM (2005). Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* 63: 191–270.
- Fredholm BB, Chern Y, Franco R, Sitkovsky M (2007). Aspects of the general biology of adenosine A_{2A} signaling. *Prog Neurobiol* 83: 263–276.
- Giménez-Llort L, Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Fredholm BB, Tobeña A, Pekny M *et al.* (2002). Mice lacking the adenosine A₁ receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci* 16: 547–550.
- Giménez-Llort L, Schiffmann SN, Shmidt T, Canela L, Camón L, Wassholm M *et al.* (2007). Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A_{2A} receptors in the brain. *Neurobiol Learn Mem* 87: 42–56.
- Harvey AL, Young LC, Kornisiuk E, Snitcowsky M, Coletti N, Blanco C *et al.* (2012). A novel dihydro-pyrazolo(3,4-d)(1,2,4)triazolo(1,5-a)pyrimidin-4-one (AJ23) is an antagonist at adenosine A₁ receptors and enhances consolidation of step-down avoidance. *Behav Brain Res* 234: 184–191.
- Hirotsu I, Hori N, Katsuda N, Ishihara T (1989). Effect of anticholinergic drug on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res* 482: 194–197.
- Jackisch R, Strittmatter H, Kasakov L, Hertting G (1984). Endogenous adenosine as a modulator of hippocampal acetylcholine release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 327: 319–325.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Animal research: Reporting *in vivo* experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.
- Klinkenberg I, Blokland A (2010). The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 1307–1350.
- Kopf SR, Melani A, Pedata F, Pepeu G (1999). Adenosine and memory storage: effect of A₁ and A₂ receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 146: 214–219.
- Laurent C, Eddarkaoui S, Derisbourg M, Leboucher A, Demeyer D, Carrier S *et al.* (2014). Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiol Aging* 35: 2079–2090.
- Marks GA, Shaffery JP, Speciale SG, Birabil CG (2003). Enhancement of rapid eye movement sleep in the rat by actions at A₁ and A_{2A} adenosine receptor subtypes with a differential sensitivity to atropine. *Neuroscience* 116: 913–920.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23: 649–711.
- McGrath J, Drummond G, McLachlan E, Kilkenny C, Wainwright C (2010). Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1573–1576.
- Mioranzzia S, Costa MS, Botton PH, Ardais AP, Matte VL, Espinosa J *et al.* (2011). Blockade of adenosine A₁ receptors prevents methylphenidate-induced impairment of object recognition task in adult mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 169–176.
- Nikodijević O, Jacobson KA, Daly JW (1993). Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 199–216.
- Oliveira L, Timóteo MA, Correia-de-Sá P (2002). Modulation by adenosine of both muscarinic M₁-facilitation and M₂-inhibition of [³H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Eur J Neurosci* 15: 1728–1736.
- Pandolfo P, Machado NJ, Köfalvi A, Takahashi RN, Cunha RA (2013). Caffeine regulates frontocorticostratial dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 23: 317–328.
- Pawson AJ, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Alexander SP, Buneman OP *et al.*; NC-IUPHAR. (2014). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY: an expert-driven knowledgebase of drug targets and their ligands. *Nucl Acids Res* 42 (Database Issue): D1098–D1106.
- Pedata F, Giovannelli L, De Sarno P, Pepeu G (1986). Effect of adenosine, adenosine derivatives, and caffeine on acetylcholine release from brain synaptosomes: interaction with muscarinic autoregulatory mechanisms. *J Neurochem* 46: 1593–1598.
- Pereira GS, Mello e Souza T, Vinadé ER, Choi H, Rodrigues C, Battastini AM *et al.* (2002). Blockade of adenosine A₁ receptors in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats. *Eur J Pharmacol* 437: 151–154.
- Pereira GS, Rossato JI, Sarkis JJ, Cammarota M, Bonan CD, Izquierdo I (2005). Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex impairs memory retrieval in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 83: 217–223.
- Prediger RD, Fernandes D, Takahashi RN (2005). Blockade of adenosine A_{2A} receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res* 159: 197–205.
- Rebola N, Lujan R, Cunha RA, Mülle C (2008). Adenosine A_{2A} receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 57: 121–134.
- Riedel W, Hogervorst E, Lebourg R, Verhey F, van Praag H, Jolles J (1995). Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 122: 158–168.
- Rodrigues RJ, Canas PM, Lopes LV, Oliveira CR, Cunha RA (2008). Modification of adenosine modulation of acetylcholine release in the hippocampus of aged rats. *Neurobiol Aging* 29: 1597–1601.
- Salamone JD, Collins-Praino LE, Pardo M, Podurgiel SJ, Baqi Y, Müller CE *et al.* (2013). Conditional neural knockout of the adenosine A_{2A} receptor and pharmacological A_{2A} antagonism reduce pilocarpine-induced tremulous jaw movements: studies with a mouse model of parkinsonian tremor. *Eur Neuropsychopharmacol* 23: 972–977.
- Snyder SH, Katims JJ, Annau Z, Bruns RF, Daly JW (1981). Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 3260–3264.

- Suzuki F, Shimada J, Shiozaki S, Ichikawa S, Ishii A, Nakamura J *et al.* (1993). Adenosine A₁ antagonists. 3. Structure–activity relationships on amelioration against scopolamine- or N6-((R)-phenylisopropyl) adenosine-induced cognitive disturbance. *J Med Chem* 36: 2508–2518.
- Tanaka Y, Sakurai M, Hayashi S (1989). Effect of scopolamine and HP 029, a cholinesterase inhibitor, on long-term potentiation in hippocampal slices of the guinea pig. *Neurosci Lett* 98: 179–183.
- Vannucchi MG, Scali C, Kopf SR, Pepeu G, Casamenti F (1997). Selective muscarinic antagonists differentially affect in vivo acetylcholine release and memory performances of young and aged rats. *Neuroscience* 79: 837–846.
- Vollert C, Forkuo GS, Bond RA, Eriksen JL (2013). Chronic treatment with DCPCX, an adenosine A₁ antagonist, worsens long-term memory. *Neurosci Lett* 548: 296–300.
- Wang JH, Ma YY, van den Buuse M (2006). Improved spatial recognition memory in mice lacking adenosine A_{2A} receptors. *Exp Neurol* 199: 438–445.
- Warburton EC, Koder T, Cho K, Massey PV, Duguid G, Barker GR *et al.* (2003). Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron* 38: 987–996.
- Winters BD, Bartko SJ, Saksida LM, Bussey TJ (2007). Scopolamine infused into perirhinal cortex improves object recognition memory by blocking the acquisition of interfering object information. *Learn Mem* 14: 590–596.
- Yang M, Soohoo D, Soelaiman S, Kalla R, Zablocki J, Chu N *et al.* (2007). Characterization of the potency, selectivity, and pharmacokinetic profile for six adenosine A_{2A} receptor antagonists. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 375: 133–144.
- Zezula J, Freissmuth M (2008). The A_{2A}-adenosine receptor: a GPCR with unique features? *Br J Pharmacol* 153 (Suppl. 1): S184–S190.
- Zhou SJ, Zhu ME, Shu D, Du XP, Song XH, Wang XT *et al.* (2009). Preferential enhancement of working memory in mice lacking adenosine A_{2A} receptors. *Brain Res* 1303: 74–83.

PARTE III

III. DISCUSSÃO

Estudos com cafeína, um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} (Fredholm *et al.*, 1999), permitiram demonstrar a participação dos receptores de adenosina nos processos cognitivos. Estes estudos revelam que a administração de cafeína melhora o desempenho tanto em roedores (Angellucci *et al.*, 1999; Arendash *et al.*, 2006; Dall'Igna *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008a; Botton *et al.*, 2010; Espinosa *et al.*, 2013; Laurent *et al.*, 2014) quanto em humanos (Maia & Mendonça, 2002; Eskelinen *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2012; Borota *et al.*, 2014). Além disso, estudos em roedores sugerem que principalmente a partir dos receptores de adenosina do tipo A_{2A} , a cafeína previne o comprometimento da memória em modelos experimentais da doença de Alzheimer (Arendash *et al.*, 2006; Dall'Igna *et al.*, 2007; Canas *et al.*, 2009; Laurent *et al.*, 2014). Apesar destes resultados, o papel dos receptores de adenosina nos processos de memória ainda não está bem esclarecido.

A escopolamina é um antagonista não seletivo de receptores colinérgicos muscarínicos do tipo M1 e M2, muito conhecido por seus efeitos amnésicos (Izquierdo, 1989; Klinkenberg & Blokland, 2010; Wu *et al.*, 2012) e vem sendo bastante utilizada para induzir déficits cognitivos em modelos animais (Dodart *et al.*, 1997; Rutten *et al.*, 2006; Botton *et al.*, 2010; Bortolotto *et al.*, 2015) e em estudos que visam melhor compreender a relação do sistema colinérgico com a DA (Gupta & Gupta, 2012; Nazarova *et al.*, 2012; Puri *et al.*, 2015).

Buscando melhor compreender o envolvimento dos receptores de adenosina nos processos de memória, o presente trabalho avaliou o impacto de bloquear seletivamente os receptores de adenosina A_1 e A_{2A} sobre o

comprometimento de memória causado pelo bloqueio dos receptores muscarínicos, por meio da administração de escopolamina em diferentes tarefas comportamentais.

Uma vez que a escopolamina administrada agudamente pode produzir hiperatividade motora (Mueller & Peel, 1990; Fritts *et al.*, 1998; Harrison *et al.*, 2010), primeiramente foram testadas baixas doses de escopolamina na memória de curta e de longa duração no RO, a fim de encontrar uma dose que apresentasse efeitos amnésicos, mas sem apresentar efeitos na locomoção. Após esta padronização foram então realizados os demais experimentos.

Entre os principais resultados encontrados, o presente estudo mostrou que o bloqueio seletivo dos receptores A_{2A} preveniu o déficit induzido por escopolamina na memória de curto prazo nas tarefas de reconhecimento de objetos, esQUIVA inibitória e labirinto em Y. Além disso, também foi evidenciado que a ativação sistêmica dos receptores A_{2A} em animais *naive* foi suficiente para prejudicar a memória de curto prazo nestas três tarefas e ainda, a ativação intracerebral dos receptores A_{2A} em animais *naive* foi suficiente para prejudicar a memória de curto prazo no RO.

Primeiramente, os resultados apresentados demonstraram que bloquear seletivamente os receptores de adenosina A_1 e A_{2A} em animais *naive*, pela administração sistêmica dos antagonistas DPCPX e SCH 58261 respectivamente, não provocou alterações na memória dos animais nas três tarefas utilizadas (RO, EI e labirinto em Y), tanto para memória de curto quanto para a de longo prazo.

Em outro protocolo experimental, quando foram bloqueados os receptores de adenosina A_{2A} , por meio da administração de SCH 58261, após a

administração sistêmica de escopolamina, foi observado que o bloqueio seletivo destes receptores preveniu o comprometimento da memória de curto prazo induzido por este antagonista muscarínico, nas três tarefas utilizadas (RO, EI e labirinto em Y). O bloqueio seletivo dos receptores de adenosina A₁, após a administração sistêmica de escopolamina também foi capaz de reverter o prejuízo da memória de reconhecimento e aversiva. Porém, o bloqueio dos receptores A₁ não foi eficiente para prevenir o comprometimento da memória causado pela escopolamina no labirinto em Y. Estes resultados demonstram que o efeito da cafeína frente a um déficit induzido por escopolamina na memória de reconhecimento e aversiva (Botton *et al.*, 2010) parece depender do antagonismo de ambos os receptores de adenosina (A₁ e A_{2A}) (Fredholm *et al.*, 1999). Estes resultados estão de acordo com um outro estudo realizado em peixes-zebra, no qual a administração dos antagonistas seletivos para os receptores A₁ e A_{2A} preveniu a amnésia induzida por escopolamina na tarefa de esquiva inibitória, sem afetar a atividade locomotora destes animais (Bortolotto *et al.*, 2015).

O impacto de bloquear seletivamente os receptores de adenosina A₁ sobre a memória ainda é bastante controverso. Na tarefa de esquiva inibitória, um estudo realizado por Pereira e colaboradores (2002) mostrou que o bloqueio dos receptores de adenosina A₁ no córtex cingulado posterior facilita a memória dos roedores. Outro estudo realizado pelo nosso grupo verificou que o bloqueio dos receptores de adenosina A₁ no déficit induzido por metilfenidato, preveniu o déficit na tarefa de reconhecimento de objetos (Mioranza *et al.*, 2011). Ainda, Harvey e colaboradores (2012) testaram um novo antagonista de receptores A₁, o AJ23 (7-methyl-1-phenyl-1,8-dihydro-pyrazolo-(3,4d)(1,2,4)-

triazolo(1,5a)-pyrimidin-4-one), e verificaram que o bloqueio do receptor A_1 foi capaz de reverter o déficit induzido por escopolamina na esQUIVA inibitória. Em contrapartida, a administração aguda de DPCPX (antagonista seletivo para os receptores A_1) não alterou a consolidação da memória na tarefa de esQUIVA inibitória (Kopf *et al.*, 1999) e o tratamento crônico com DPCPX prejudicou a memória de longo prazo no labirinto aquático de Morris (Vollert *et al.*, 2013).

De fato, alguns estudos mostram que o bloqueio dos receptores A_1 pode ser benéfico para a memória, enquanto outros estudos demonstram que pode ser prejudicial ou ainda não produzir nenhum efeito. Esta variabilidade dos resultados provavelmente está relacionada aos diferentes protocolos de administração dos fármacos utilizados. É importante ressaltar também que a ativação de receptores A_1 em geral provoca sedação profunda (Snyder *et al.*, 1981; Bruns *et al.*, 1983) e este fato limita o uso dos agonistas A_1 , pois dependendo da via de administração e das doses utilizadas pode haver um prejuízo na locomoção desses animais e por consequência prejudicar o desempenho nas tarefas.

O bloqueio dos receptores de adenosina A_1 na prevenção dos déficits induzidos por escopolamina observados neste estudo está de acordo com a importância destes receptores na modulação colinérgica, interagindo com receptores muscarínicos M1 e M2 (Pedata *et al.*, 1986; Oliveira *et al.*, 2002), reforçando a liberação de acetilcolina (Pedata *et al.*, 1986; Cunha *et al.*, 1994) e inibindo de forma eficaz a liberação de acetilcolina no córtex límbico (Jackisch *et al.*, 1984; Cunha *et al.*, 1994).

Já os efeitos benéficos dos antagonistas de receptores A_{2A} em prevenir prejuízos na memória não podem ser explicados pela inibição da liberação de

acetilcolina a partir de preparações corticais límbicas (Rodrigues *et al.*, 2008). Sendo assim, é mais provável que não esteja relacionado diretamente com o sistema colinérgico, mas com a capacidade que os antagonistas de receptores A_{2A} possuem de controlar a plasticidade sináptica em circuitos corticais (Rebola *et al.*, 2008; Costenla *et al.*, 2011), que é discutida para ser a base neurofisiológica do aprendizado e da memória (Martin *et al.*, 2000). Isto explicaria a prevenção dos prejuízos de memória causados pela administração dos antagonistas de receptores A_{2A} nas diferentes condições citadas anteriormente (Prediger *et al.*, 2005b; Dall'Igna *et al.*, 2007; Canas *et al.*, 2009; Batalha *et al.*, 2013), inclusive após a administração aguda de escopolamina, de acordo com os nossos resultados. Assim, a eficácia dos antagonistas de receptores A_{2A} pode estar relacionada a um equilíbrio entre a normalização da plasticidade sináptica e seus efeitos prejudiciais sobre o sistema colinérgico.

Este conjunto de resultados torna os receptores A_{2A} um alvo preferencial para os benefícios da cafeína na promoção da neuroproteção contra os déficits cognitivos observados em modelos experimentais de doença de Alzheimer (Arendash *et al.*, 2006; Dall'Igna *et al.*, 2007; Canas *et al.*, 2009; Espinosa *et al.*, 2013). No entanto, é importante ressaltar que os mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos de antagonistas A_1 e A_{2A} em resposta a amnésia induzida por escopolamina são difíceis de esclarecer. Um dos motivos é o fato de que as bases neurofisiológicas da amnésia envolvendo a escopolamina ainda não são claras, uma vez que os efeitos da escopolamina sobre a plasticidade sináptica não são consistentemente observados.

Os efeitos da escopolamina na potenciação de longa duração (LTP do inglês *long term potentiation*) e na depressão de longa duração (LTD do inglês

long term depression) são controversos. Prévio estudo mostrou que a escopolamina altera a LTP em fatias de hipocampo (Hirotsu *et al.*, 1989). Em outro estudo, a escopolamina não apresentou efeito sobre a LTP na região CA1 mas diminuiu significativamente a LTP na região CA3 em fatias de hipocampo (Tanaka *et al.*, 1989). Mais recentemente, a escopolamina bloqueou a produção da LTD, mas não da LTP em fatias de córtex perirrinal (Warburton *et al.*, 2003).

Agonistas de receptores M1 e inibidores da acetilcolinesterase apresentam efeitos benéficos na memória (Fisher, 2012) enquanto que a escopolamina atua na estimulação da liberação de acetilcolina, de modo semelhante aos antagonistas de receptores muscarínicos M1, promovendo efeitos amnésicos já bem estabelecidos (Vannucchi *et al.*, 1997). Em contrapartida, a administração de escopolamina no córtex perirrinal pode melhorar a memória de reconhecimento de objetos (Winters *et al.*, 2007). Estes achados fortalecem a ideia de que os efeitos da amnésia induzida pela administração sistêmica da escopolamina sejam mediados por circuito (ou seja, afetando diferentes regiões do cérebro e suas conexões) ao invés de estarem relacionados a eventos neuroquímicos isolados (ou seja, restritos a uma única alteração molecular em uma região definida do cérebro). Além disso, estes dados poderiam explicar resultados anteriores nos quais o bloqueio de receptores A_{2A} não foi totalmente eficaz para prevenir o comprometimento da memória espacial causado por escopolamina (Cunha *et al.*, 2008), mesmo utilizando diferentes doses de escopolamina e de antagonistas A_{2A}.

Posteriormente, foi investigada a ativação dos receptores de adenosina A_{2A}, pela administração sistêmica do agonista CGS 21680. Os resultados

obtidos demonstraram que em animais *naïve* essa ativação foi suficiente para prejudicar a memória de curto prazo nas três tarefas comportamentais estudadas, mostrando que os receptores A_{2A} são necessários e suficientes para comprometer a memória de curta duração. Este efeito foi prevenido pela administração do antagonista de receptores A_{2A} , SCH 58261. Deficits similares de desempenho na memória de trabalho foram observados em animais transgênicos que superexpressam o receptor A_{2A} no prosencéfalo (Gimenez-Llort *et al.*, 2007). Além disso, a análise post-mortem do córtex frontal de pacientes com DA revelou um aumento significativo na expressão dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} em estágios iniciais e avançados da doença (Albasanz *et al.*, 2008).

É importante ressaltar que as doses de CGS 21680 utilizadas neste trabalho não afetaram a atividade locomotora dos animais, diferentemente da diminuição na locomoção observada com a administração de CPA (agonista de receptores de adenosina A_1) já relatada anteriormente (El Yacoubi *et al.*, 2000). E em razão desta diminuição da locomoção provocada pelo agonista A_1 , não foi possível testar o impacto da ativação dos receptores A_1 frente ao déficit induzido por escopolamina.

Visando excluir os efeitos periféricos causados por CGS 21680 como uma possível causa para a diminuição da memória observada na tarefa de RO e na tentativa de comprovar que o efeito encontrado era predominantemente central, CGS 21680 foi administrado diretamente nos ventrículos laterais dos animais (i.c.v). Estes resultados mostraram que a infusão de CGS 21680 extinguiu a memória de reconhecimento e indicam que os efeitos são centrais. Os resultados obtidos estão de acordo com estudos prévios, os quais

descreveram que a ativação dos receptores de adenosina A_1 no hipocampo interfere nos processos neurais envolvidos na memória de trabalho (Ohno & Watanabe, 1996) e também que a injeção de CGS 21680 diretamente no córtex cingulado posterior causa prejuízos na tarefa de esQUIVA inibitória (Pereira *et al.*, 2005).

Finalmente, foi observado que o agonista de receptores A_{2A} , CGS 21680, não afetou o comprometimento da memória causada por escopolamina na tarefa de RO. Uma vez que temos um efeito máximo da escopolamina sobre a memória de reconhecimento, seria difícil verificar uma interação entre os dois fármacos. Este conjunto de evidências sugerem que a ativação dos receptores de adenosina A_{2A} é prejudicial para a memória e isto se torna particularmente relevante para uma melhor compreensão do mecanismo de sinalização envolvendo os receptores A_{2A} (Fredholm *et al.*, 2007; Zezula & Freissmuth, 2008).

IV. CONCLUSÃO

O presente estudo estabeleceu o envolvimento do antagonismo de ambos os receptores de adenosina (A_1 e A_{2A}) como provável mecanismo subjacente ao efeito benéfico da cafeína para evitar o prejuízo de memória causado por escopolamina. Neste estudo também foi observado que a ativação dos receptores A_{2A} é suficiente para desencadear prejuízos na memória, sugerindo que a ativação do receptor A_{2A} seja um dos mecanismos envolvidos nos déficits de memória. Além disso, os resultados apresentados indicam que os receptores de adenosina A_1 participam de maneira seletiva no controle dos prejuízos cognitivos relacionados ao sistema colinérgico. Portanto, o conjunto dos nossos resultados contribuem para o melhor conhecimento dos efeitos da cafeína nos processos mnemônicos e reforçam o interesse terapêutico nos receptores de adenosina A_{2A} na modulação dos mecanismos de memória. Além disso nosso estudo contribui para o desenvolvimento de novas pesquisas relacionadas a interação entre os sistemas adenosinérgico e colinérgico.

V- PERSPECTIVAS

Para dar continuidade ao estudo aqui apresentado, temos como perspectivas:

- Avaliar os efeitos da administração central de CPA (agonista A_1), SCH 58261 (antagonista A_{2A}) e DPCPX (antagonista A_1) em outras fases (consolidação e evocação), dos três diferentes tipos memória;
- Investigar a resposta dos animais envelhecidos frente a manipulação farmacológica desses receptores nos três tipos de memória avaliados nesse trabalho;
- Identificar quais as vias de sinalização operadas pelos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} estão envolvidas nos efeitos sobre as memórias estudadas nesse trabalho.

VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acquas E, Tanda G, Di Chiara G. Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats. *Neuropsychopharmacology* 2002;27:182–93.

Allgaier M, Allgaier C. An update on drug treatment options of Alzheimer's disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19:1345-54.

Akkerman S, Blokland A, Reneerkens O, van Goethem NP, Bollen E, Gijssels HJ, Lieben CK, Steinbusch HW, Prickaerts J. Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behav Brain Res*. 2012;232(2):335-47.

Albasanz JL, Perez S, Barrachina M, Ferrer I, Martin M. Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2008; 18: 211-9.

Alonso M, Bekinschtein P, Cammarota M, Vianna MR, Izquierdo I, Medina JH. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn Mem*. 2005 Sep-Oct;12(5):504-10.

Angelucci ME, Vital MA, Cesario C, Zadusky CR, Rosalen PL, Da Cunha C. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. *Eur J Pharmacol* 1999; 373: 135-140.

Arendash GW, Cao C. Caffeine and Coffee as Therapeutics Against Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2010; 20 S117–S126 S117.

Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, Shippy D, Tan J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience*. 2006; 142: 941-952.

Baratti CM, Boccia MM, Blake MG. Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. *Braz J Med Biol Res*. 2009; 42(2):148-54.

Barker GR, Warburton EC. When is the hippocampus involved in recognition memory? *J Neurosci*. 2011;31:10721-31.

Barros DM, Izquierdo LA, Mello e Souza T, Ardenghi PG, Pereira P, Medina JH, Izquierdo I. Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behav Brain Res*. 2000;114(1-2):183-92.

Barros DM, Mello e Souza T, De David T, Choi H, Aguzzoli A, Madche C, Ardenghi P, Medina JH, Izquierdo I. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic

muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behav Brain Res.* 2001;124(1):1-7.

Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* 2000; 163: 495-529.

Batalha VL, Pego JM, Fontinha BM, Costenla AR, Valadas JS, Baqi Y, Radjainia H, Müller CE, Sebastião AM, Lopes LV. Adenosine A2A receptor blockade reverts hippocampal stress-induced deficits and restores corticosterone circadian oscillation. *Mol Psychiatry.* 2013; 18: 320-331.

Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron.* 2007;53(2):261-77.

Bekinschtein P, Katche C, Slipczuk L, Gonzalez C, Dorman G, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotox Res.* 2010;18(3-4):377-85.

Benarroch EE. Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology.* 2008; 70:231-236.

Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc.* 2006; 1(3), 1306-1311.

Bianchin M, Mello e Souza T, Medina JH, Izquierdo I. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 1999;71(2):127-31.

Blake MG, Krawczyk MC, Baratti CM, Boccia MM. Neuropharmacology of memory consolidation and reconsolidation: Insights on central cholinergic mechanisms. *J Physiol Paris.* 2014;108(4-6):286-91.

Boison D. Adenosine as a modulator of brain activity. *Drug News Perspect.* 2007; 20(10):607-11.

Boison D. Adenosine dysfunction in epilepsy. *Glia.* 2012; 60(8), 1234–1243.

Bonner TI. The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci.* 1989; 12(4):148–151.

Borota D, Murray E, Keceli G, Chang A, Watabe JM, Ly M, Toscano JP, Yassa MA. Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. *Nat Neurosci* 2014; 17: 201-203.

Bortolotto JW, Melo GM, Cognato G de P, Vianna MR, Bonan CD. Modulation of adenosine signaling prevents scopolamine - induced cognitive impairment in zebrafish. *Neurobiol Learn Mem.* 2015;118:113-9.

Botton PH, Costa MS, Ardais AP, Mioranza S, Souza DO, da Rocha JB, Porciúncula LO. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behav Brain Res* 2010; 214:254-259.

Brambilla D, Chapman D, Greene R. Adenosine mediation of presynaptic feedback inhibition of glutamate release. *Neuron.* 2005;46(2):275-83.

Brundege JM, Diao L, Proctor WR, Dunwiddie TV. The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. *Neuropharmacology.* 1997; 36(9):1201-10.

Bruns RF, Katims JJ, Annau Z, Snyder SH, Daly JW. Adenosine receptor interactions and anxiolytics. *Neuropharmacology.* 1983; 22: 1523-1529.

Cahill L, Haier RJ, Fallon J, Alkire MT, Tang C, Keator D, Wu J, McGaugh JL. Amygdala activity at encoding correlated with long-term, free recall of emotional information. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(15):8016-21.

Cahill L, McGaugh JL. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci.* 1998;21(7):294-9.

Callahan H, Ikeda-douglas C, Head E, Cotman CW, Milgram NW. Development of a protocol for studying object recognition memory in the dog. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2000;24:693–707.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I, Medina JH. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;76(1):36-46.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Kerr D, 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. *J Neurosci*. 2003; 23(3):737-41.

Canas PM, Porciuncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, Oliveira CR, Cunha RA. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci*. 2009; 29: 14741-14751.

Cao C, Loewenstein DA, Lin X, Zhang C, Wang L, Duara R, Wu Y, Giannini A, Bai G, Cai J, Greig M, Schofield E, Ashok R, Small B, Potter H, Arendash GW. High Blood caffeine levels in MCI linked to lack of progression to dementia. *J Alzheimers Dis*. 2012; 30: 559-572.

Carew TJ. Molecular enhancement of memory formation. *Neuron*. 1996; 16(1):5-8.

Caulfield MP. Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther*. 1993; 58(3):319–379.

Cercato MC, Colettis N, Snitcofsky M, Aguirre AI, Kornisiuk EE, Baez MV, Jerusalinsky DA. Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory. *J Physiol Paris*. 2014;108(4-6):263-9.

Chang EH, Huerta PT. Neurophysiological correlates of object recognition in the dorsal subiculum. *Front Behav Neurosci*. 2012;6:46.

Chen JF. Adenosine receptor control of cognition in normal and disease. *Int Rev Neurobiol*. 2014;119:257-307.

Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets-what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov*. 2013; 12: 265-286.

Chen JF, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, Beilstein M, Sonsalla PK, Castagnoli K, Castagnoli N Jr, Schwarzschild MA. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2001;21(10):RC143.

Childs E, de Wit H. Subjective, behavioral, and physiological effects of acute caffeine in light, nondependent caffeine users. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;185(4):514-23.

Childs E, Hohoff C, Deckert J, Xu K, Badner J, de Wit H. Association between ADORA2A and DRD2 polymorphisms and caffeine-induced anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33:2791–2800.

Cognato GP, Agostinho PM, Hockemeyer J, Müller CE, Souza DO, Cunha RA. Caffeine and an adenosine A(2A) receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. *J Neurochem*. 2010;112(2):453-62.

Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS. Chronic stress impairs rats spatial memory on the Y maze, and its effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behavioral Neuroscience*. 1996; 110, 1321–1334.

Cornelis MC, El-Sohemy A, Campos H. Genetic polymorphism of the adenosine A2A receptor is associated with habitual caffeine consumption. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(1):240-4.

Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Ardais AP, Moreira JD, Souza DO, Porciúncula LO. Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunocontent in the hippocampus. *Neurochem Int* 2008a; 53: 89-94.

Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Souza DO, Porciúncula LO. Caffeine prevents age – associated recognition memory decline and changes brain – derived neurotrophic factor and tirosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience*. 2008b; 2;153(4):1071-8

Costenla AR, Diogenes MJ, Canas PM, Rodrigues RJ, Nogueira C, Maroco J, Agostinho PM, Ribeiro JA, Cunha RA, de Mendonça A. Enhanced role of adenosine A2A receptors in the modulation of LTP in the rat hippocampus upon ageing. *Eur J Neurosci*. 2011; 34: 12-21.

Cox BC, Marritt AM, Perry DC, Kellar KJ. Transport of multiple nicotinic acetylcholine receptors in the rat optic nerve: high densities of receptors containing $\alpha 6$ and $\beta 3$ subunits. *J Neurochem*. 2008;105(5):1924-38.

Cummings JL, Back C. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*. 1998;6:64-78.

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

Cunha RA. Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity. *Neurochem Int*. 2008; 52: 65-72.

Cunha GM, Canas PM, Melo CS, Hockemeyer J, Müller CE, Oliveira CR, Cunha RA. Adenosine A2A receptor blockade prevents memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Exp Neurol.* 2008; 210(2):776-81.

Cunha RA, Milusheva E, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastiao AM. Excitatory and inhibitory effects of A1 and A2A adenosine receptor activation on the electrically evoked [3H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. *J Neurochem.* 1994; 63: 207-214.

Dale HH. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1914;6:147-90.

Dall'Igna OP, Porciúncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol.* 2003; 138(7):1207-9.

Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Caffeine and adenosine A2A receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol.* 2007; 203: 241-245.

Daly JW, Padgett WL. Agonist activity of 2- and 5'-substituted adenosine analogs and their N6-cycloalkyl derivatives at A1- and A2-adenosine receptors coupled to adenylate cyclase. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43(5):1089-93.

Danion JM, Kauffmann-Muller F, Grangé D, Zimmermann MA, Greth P. Affective valence of words, explicit and implicit memory in clinical depression. *J Affect Disord.* 1995;34(3):227-34.

Dellu F, Mayo W, Cherkaoui J, Le Moal M, Simon H. A two-trial memory task with automated recording: Study in young and aged rats. *Brain Research.* 1992; 588, 132–139.

Dellu F, Contarino A, Simon H, Koob GF, Gold LH. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2000;73(1):31-48.

De-Mello N, Carobrez AP. Elevated T-maze as an animal model of memory: effects of scopolamine. *Behav Pharmacol* 2002;13:139–48.

de Mendonça A, Almeida T, Bashir ZI, Ribeiro JA. Endogenous adenosine attenuates long-term depression and depotentiation in the CA1 region of the rat hippocampus. *Neuropharmacology.* 1997;36(2):161-7.

de Mendonça A, Ribeiro JA. Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience.* 1994;62(2):385-90.

Dickerson BC, Eichenbaum H. The episodic memory system: neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:86–104.

Dixon AK, Gubitzi AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *British Journal of Pharmacology*. 1996; 118, 1461–1468.

Dodart JC, Mathis C, Ungerer A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *Neuroreport* 1997;8:1173–8.

Doralp S, Leung LS. Cholinergic modulation of hippocampal CA1 basal-dendritic long-term potentiation. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;90(2):382-8.

Eltzschig HK. Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology*. 2009;111(4):904-15.

El Yacoubi M, Ledent C, Menard JF, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *Br J Pharmacol*. 2000; 129: 1465-1473.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988;31:47-59.

Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *J Alzheimers Dis* 2009; 16: 85-91.

Espinosa J, Rocha A, Nunes F, Costa MS, Schein V, Kazlauckas V, Kalinine E, Souza DO, Cunha RA, Porciúncula LO. Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. *J Alzheimers Dis.* 2013; 34: 509-518.

Ferré 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(10):482-7.

Fisher A. Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2012; 120 Suppl 1: 22-33.

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

Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol.* 2005; 63: 191-270.

Fredholm BB, Chern Y, Franco R, Sitkovsky M. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog Neurobiol.* 2007; 83: 263-276.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001; 53(4):527-52.

Fredholm BB, Persson CG. Xanthine derivatives as adenosine receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 1982;81(4):673-6.

Fritts ME, Mueller K, Morris L. Locomotor stereotypy produced by dexbenzetimide and scopolamine is reduced by SKF 83566, not sulpiride. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998;60(3):639-44.

Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J Pharmacol Sci.* 2008;106(2):186-92.

Gifford AK, Cloutier S, Newberry RC. Objects as enrichment: effects of object exposure time and delay interval on object recognition memory of the domestic pig. *Applied Animal Behaviour Science* 2007;107:206–17.

Gimenez-Llort L, Schiffmann SN, Shmidt T, Canela L, Camon L, Wassholm M, Canals M, Terasmaa A, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Popova E, Ferré S, Agnati L, Ciruela F, Martínez E, Scheel-Kruger J, Lluís C, Franco R, Fuxe K, Bader M. Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain. *Neurobiol Learn Mem.* 2007; 87: 42-56.

Giovannini MG, Lana D, Pepeu G. The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2015;119:18-33

Gold, PE. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology.* 1986; 46, 87–98.

Groleau M, Kang JI, Huppé-Gourgues F, Vaucher E. Distribution and effects of the muscarinic receptor subtypes in the primary visual cortex. *Front Synaptic Neurosci.* 2015;7:10.

Gupta R, Gupta LK. Improvement in long term and visuo-spatial memory following chronic pioglitazone in mouse model of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;102(2):184-90.

Hajilou BB, Done DJ. Evidence for a dissociation of structural and semantic knowledge in dementia of the Alzheimer type (DAT). *Neuropsychologia.* 2007, 45(4), 810–816.

Hamilton E, Nathanson NM. The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. *J Biol Chem.* 2001; 276(19):15850-3.

Hanggi EB. Rotated object recognition in four domestic horses (*Equus caballus*). *Journal of Equine Veterinary Science* 2010:30.

Harrison FE, May JM, McDonald MP. Vitamin C deficiency increases basal exploratory activity but decreases scopolamine-induced activity in APP/PSEN1 transgenic mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010; 94 (4): 543-52.

Harvey AL, Young LC, Kornisiuk E, Snitcofsky M, Colettis N, Blanco C, Jerusalinsky D, Jamieson AG, Hartley RC, Stone TW. A novel dihydropyrazolo (3,4d)(1,2,4)triazolo(1,5a)pyrimidin-4-one (AJ23) is an antagonist at adenosine A1 receptors and enhances consolidation of step-down avoidance. *Behav Brain Res.* 2012; 234: 184-191.

Hershfield MS. New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur J Immunol* 2005 35: 25–30.

Hirotsu I, Hori N, Katsuda N, Ishihara T. Effect of anticholinergic drug on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1989; 482: 194-197.

Hughes RN. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004;28(5):497-505.

Ikeda K, Kurokawa M, Aoyama S, Kuwana Y. Neuroprotection by adenosine A2A receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2002;80(2):262-70.

Irle E, Kessler J, Markowitsch HJ, Hofmann W. Primate learning tasks reveal strong impairments in patients with presenile or senile dementia of the Alzheimer type. *Brain and Cognition*. 1987, 6(4), 429–449.

Izquierdo I. Mechanism of action of scopolamine as an amnestic. *Trends Pharmacol Sci*. 1989;10(5):175-7.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998;393(6686):635-6.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*. 2006;29(9):496-505.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*. 1997;68(3):285-316.

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*. 1999;103(1):1-11.

Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, deDavid e Silva T, Choi H, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol*. 2002;22(3):269-87.

Jackisch R, Strittmatter H, Kasakov L, Hertting G. Endogenous adenosine as a modulator of hippocampal acetylcholine release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1984; 327: 319-325.

Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Izquierdo I. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochem Res.* 1997; 22(4):507-15.

Johnson-Kozlow M, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E, Morton D. Coffee consumption and cognitive function among older adults. *Am J Epidemiol.* 2002;156(9):842-50.

Kachroo A, Schwarzschild MA. Adenosine A2A receptor gene disruption protects in an α -synuclein model of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2012; 71(2):278-82.

Kaster MP, Machado NJ, Silva HB, Nunes A, Ardais AP, Santana M, Baqi Y, Müller CE, Rodrigues AL, Porciúncula LO, Chen JF, Tomé ÂR, Agostinho P, Canas PM, Cunha RA. Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(25):7833-8.

Kendler KS, Prescott CA. Caffeine intake, tolerance, and withdrawal in women: a population-based twin study. *Am J Psychiatry.* 1999;156(2):223-8.

Klinkenberg I, Blokland A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Bio behav Rev.* 2010; 34: 1307-1350.

Kopf SR, Melani A, Pedata F, Pepeu G. Adenosine and memory storage: effect of A1 and A2 receptor antagonists. *Psychopharmacology.* 1999; 146: 214-219.

Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 2001; 79(3): 463-84.

Laurent C, Eddarkaoui S, Derisbourg M, Leboucher A, Demeyer D, Carrier S, Schneider M, Hamdane M, Müller CE, Buée L, Blum D. Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiol Aging.* 2014; 35: 2079-2090.

Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P et al. Object recognition test in mice. *Nat Protoc.* 2013; 8(12):2531-7.

Leite MR, Wilhelm EA, Jesse CR, Brandão R, Nogueira CW. Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. *Exp Gerontol.* 2011;46(4):309-15.

Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci.* 1991;11(10):3218-26.

Li P, Rial D, Canas PM, Yoo JH, Li W, Zhou X, Wang Y, van Westen GJ, Payen MP, Augusto E, Gonçalves N, Tomé AR, Li Z, Wu Z, Hou X, Zhou Y, PIJzerman A, Boyden ES, Cunha RA, Qu J, Chen JF. Optogenetic activation of intracellular adenosine A2A receptor signaling in the hippocampus is sufficient to trigger CREB phosphorylation and impair memory. *Mol Psychiatry.* 2015. doi: 10.1038/mp.2014.182.

Maia L, de Mendonça A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol.* 2002;9(4):377-82.

Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 2000; 23: 649-711.

McGaugh JL. Time-dependent processes in memory storage. *Science.* 1966 Sep 16;153(3742):1351-8.

McGaugh JL. Memory - a century of consolidation. *Science.* 2000; 287(5451):248-51.

McQuiston AR. Acetylcholine release and inhibitory interneuron activity in hippocampal CA1. *Front Synaptic Neurosci.* 2014 Sep 16;6:20.

Menezes J, Alves N, Borges S, Roehrs R, de Carvalho Myskiw J, Furini CR, Izquierdo I, Mello-Carpes PB. Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(13):E1652-8

Mihara T, Mihara K, Yarimizu J, Mitani Y, Matsuda R, Yamamoto H, Aoki S, Akahane A, Iwashita A, Matsuoka N. Pharmacological characterization of a novel, potent adenosine A1 and A2A receptor dual antagonist, 5-[5-amino-3-(4-fluorophenyl)pyrazin-2-yl]-1-isopropylpyridine-2(1H)-one (ASP5854), in models of Parkinson's disease and cognition. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;323(2):708-19.

Mioranza S, Costa MS, Botton PH, Ardais AP, Matte VL, Espinosa J, Souza DO, Porciúncula LO. Blockade of adenosine A1 receptors prevents methylphenidate-induced impairment of object recognition task in adult mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011; 35: 169-176.

Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F. Cholinergic activity in the insular cortex is necessary for acquisition and consolidation of contextual memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2007; 87(3):343-51.

Mitchell SH, de Wit H, Zacny JP. Caffeine withdrawal symptoms and self-administration following caffeine deprivation. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995;51(4):941-5.

Mueller K, Peel JL. Scopolamine produces locomotor stereotypy in an open field but apomorphine does not. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990; 36(3):613-7.

Nathanson NM. Synthesis, trafficking, and localization of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Ther.* 2008; 119(1):33-43.

Nazarova GA, Kolyasnikova KN, Zolotov NN. Changes in activity of proline-specific peptidases in rat model for dementia of Alzheimer's type. *Bull Exp Biol Med.* 2012;153(5):674-6.

Niimi K, Nishioka C, Miyamoto T, Takahashi E, Miyoshi I, Itakura C, Yamashita T. Improvement of spontaneous alternation behavior deficit by activation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor signaling in the ganglioside GM3-deficient mice. *Biomed Res* 2013; 34(4):189-95.

Normile HJ, Barraco RA. N6- cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A1 receptors. *Brain Res Bull.* 1991;27(1):101-4.

Ohno M, Watanabe S. Working memory failure by stimulation of hippocampal adenosine A1 receptors in rats. *Neuroreport.* 1996;7(18):3013-6.

Oliveira L, Timoteo MA, Correia-de-Sa P. Modulation by adenosine of both muscarinic M1-facilitation and M2-inhibition of [3H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Eur J Neurosci.* 2002; 15: 1728-1736.

Palacios N, Gao X, McCullough ML, Schwarzschild MA, Shah R, Gapstur S, Ascherio A. Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Mov Disord.* 2012;27(10):1276-82.

Pedata F, Giovannelli L, De Sarno P, Pepeu G. Effect of adenosine, adenosine derivatives, and caffeine on acetylcholine release from brain synaptosomes: interaction with muscarinic autoregulatory mechanisms. *J Neurochem.* 1986; 46: 1593-1598.

Pereira GS, Mello e Souza T, Vinade ER, Choi H, Rodrigues C, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ, Bonan CD. Blockade of adenosine A1 receptors in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats. *Eur J Pharmacol.* 2002; 437: 151-154.

Pereira GS, Rossato JI, Sarkis JJ, Cammarota 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; 83: 217-223.

Petit GH, Tobin C, Krishnan K, Moricard Y, Covey DF, Rondi-Reig L, Akwa Y. Pregnenolone sulfate and its enantiomer: differential modulation of memory in a spatial discrimination task using forebrain NMDA receptor deficient mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011; 21(2):211-5.

Pickering C, Alsiö J, Morud J, Ericson M, Robbins TW, Söderpalm B. Ethanol impairment of spontaneous alternation behaviour and associated changes in medial prefrontal glutamatergic gene expression precede putative markers of dependence. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015;132:63-70.

Pires VA, Pamplona FA, Pandolfo P, Fernandes D, Prediger RD, Takahashi RN. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Pharmacol.* 2009;20(2):134-45.

Prediger RD, Batista LC, Takahashi RN. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats, Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol Aging.* 2005a;26(6):957-64.

Prediger RD, Fernandes D, Takahashi RN. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res.* 2005b; 159: 197-205.

Puri V, Wang X, Vardigan JD, Kuduk SD, Uslaner JM. The selective positive allosteric M1 muscarinic receptor modulator PQCA attenuates learning and memory deficits in the Tg2576 Alzheimer's disease mouse model. *Behav Brain Res.* 2015;287:96-9.

Rebola N, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience*. 2005;132(4):893-903.

Rebola N, Lujan R, Cunha RA, Mulle C. Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*. 2008; 57: 121-134

Rial D, Castro AA, Machado N, Garção P, Gonçalves FQ, Silva HB, Tomé AR, Köfalvi A, Corti O, Raisman-Vozari R, Cunha RA, Prediger RD. Behavioral phenotyping of Parkin-deficient mice: looking for early preclinical features of Parkinson's disease. *PLoS One*. 2014;9(12):e114216.

Ribeiro JA, Sebastião AM, Mendonça A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol*. 2003; 68 (6), 377–392.

Riedel W, Hogervorst E, Lebox R, Verhey F, van Praag H, Jolles J. Caffeine attenuates scopolamine induced memory impairment in humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995; 122: 158-168.

Ritchie K, Carrière I, de Mendonca A, Portet F, Dartigues JF, Rouaud O, Barberger-Gateau P, Ancelin ML. The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology*. 2007; 7;69(6):536-45.

Robbins TW, Semple J, Kumar R, Truman MI, Shorter J, Ferraro A, Fox B, McKay G, Matthews K. Effects of scopolamine on delayed-matching-to-sample and paired associates tests of visual memory and learning in human subjects: Comparison with diazepam and implications for dementia. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997; 134(1), 95–106.

Rodrigues RJ, Canas PM, Lopes LV, Oliveira CR, Cunha RA. Modification of adenosine modulation of acetylcholine release in the hippocampus of aged rats. *Neurobiol Aging*. 2008; 29: 1597-1601.

Roldán G, Cobos-Zapíaín G, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. Dose- and time-dependent scopolamine-induced recovery of an inhibitory avoidance response after its extinction in rats. *Behav Brain Res* 2001;121:173–9.

Roosendaal B, McGaugh JL. Memory modulation. *Behav Neurosci*. 2011; 125(6):797-824.

Rossato JI, Bevilaqua LR, Lima RH, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neuroscience*. 2006;143(1):15-23.

Rubaj A, Zgodzinski W, Sieklucka-Dziuba M. The influence of adenosine A3 receptor agonist: IB-MECA, on scopolamine- and MK-801-induced memory impairment. *Behav Brain Res* 2003;141:11–7.

Rutten K, Prickaerts J, Blokland A. Rolipram reverses scopolamine-induced and time-dependent memory deficits in object recognition by different mechanisms of action. *Neurobiol Learn Mem* 2006;85:132–8.

Sallaberry C, Nunes F, Costa MS, Fioreze GT, Ardais AP, Botton PH, Klaudat B, Forte T, Souza DO, Elisabetsky E, Porciúncula LO. Chronic caffeine prevents changes in inhibitory avoidance memory and hippocampal BDNF immunocontent in middle-aged rats. *Neuropharmacology*. 2013;64:153-9.

Sarter M, Parikh V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:48–56.

Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, Morelli M. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 2006;29(11):647-54.

Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1996;48(3):167-89.

Sebastião AM, Ribeiro JA. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(9):341-6.

Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7^a edição. Chapter 11: Acetylcholine; Elsevier Academic Press, 2006. pg. 192.

Sierksma AS, Van Den Hove DL, Pfau F, Philippens M, Bruno O, Fedele E, Ricciarelli R, Steinbusch HW, Vanmierlo T, Prickaerts J. Improvement of spatial memory function in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice after chronic inhibition of phosphodiesterase type 4D. *Neuropharmacology* 2014; 77, 120–130.

Sik A, van Nieuwehuyzen P, Prickaerts J, Blokland A. Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behav Brain Res.* 2003; 147(1-2):49-54.

Simonyi A, Schachtman TR, Christoffersen GR. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonism in learning and memory. *Eur J Pharmacol.* 2010;639(1-3):17-25.

Snyder SH, Katims JJ, Annau Z, Bruns RF, Daly JW. Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78: 3260-3264.

Squire LR, Zola-Morgan M. *Conscious and unconscious memory systems.* Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7(3):a021667.

Tanaka Y, Sakurai M, Hayashi S. Effect of scopolamine and HP 029, a cholinesterase inhibitor, on longterm potentiation in hippocampal slices of the guinea pig. *Neurosci Lett.* 1989; 98: 179-183.

Tang Y, Mishkin M, Aigner TG. Effects of muscarinic blockade in perirhinal cortex during visual recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(23):12667–12669.

Tinsley CJ, Fontaine-Palmer NS, Vincent M, Endean EP, Aggleton JP, Brown MW, Warburton EC. Differing time dependencies of object recognition memory impairments produced by nicotinic and muscarinic cholinergic antagonism in perirhinal cortex. *Learn Mem*. 2011;18(7):484-92.

van Goethem NP, Rutten K, van der Staay FJ, Jans LA, Akkerman S, Steinbusch HW, Blokland A, van't Klooster J, Prickaerts J. Object recognition testing: rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle. *Behav Brain Res*. 2012; 232(2):323-34.

Vannucchi MG, Scali C, Kopf SR, Pepeu G, Casamenti F. Selective muscarinic antagonists differentially affect in vivo acetylcholine release and memory performances of young and aged rats. *Neuroscience*. 1997; 79:837-846.

Vollert C, Forkuo GS, Bond RA, Eriksen JL. Chronic treatment with DCPCX, an adenosine A1 antagonist, worsens long-term memory. *Neurosci Lett*. 2013; 548: 296-300.

Warburton EC, Koder T, Cho K, Massey PV, Duguid G, Barker GR, Aggleton JP, Bashir ZI, Brown MW. Cholinergic neurotransmission is essential for

perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron*. 2003; 38: 987-996.

Wei CJ, Singer P, Coelho J, Boison D, Feldon J, Yee BK, Chen JF. Selective inactivation of adenosine A_{2A} receptors in striatal neurons enhances working memory and reversal learning. *Learn Mem*. 2011; 18:459–474.

Winters BD, Bartko SJ, Saksida LM, Bussey TJ. Scopolamine infused into perirhinal cortex improves object recognition memory by blocking the acquisition of interfering object information. *Learn Mem*. 2007; 14: 590- 596.

Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32:1055-70.

Wu JQ, Peters GJ, Rittner P, Cleland TA, Smith DM. The hippocampus, medial prefrontal cortex, and selective memory retrieval: evidence from a rodent model of the retrieval-induced forgetting effect. *Hippocampus*. 2014;24(9):1070-80.

Wu W, Saunders RC, Mishkin M, Turchi J. Differential effects of m1 and m2 receptors antagonists in perirhinal cortex on visual recognition memory in monkeys. *Neurobiol Learn Mem*. 2012; 98(1):41-6.

Xiao D, Cassin JJ, Healy B, Burdett TC, Chen JF, Fredholm BB, Schwarzschild MA. Deletion of adenosine A₁ or A_{2A} receptors reduces L-3,4-

dihydroxyphenylalanine- induced dyskinesia in a model of Parkinson's disease. Brain Res. 2011; 7;1367:310-8.

Xu K, Xu YH, Chen JF, Schwarzschild MA. Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. Neuroscience. 2010; 5;167(2):475-81.

Zanatta MS, Quillfeldt JH, Schaeffer E, Schmitz PK, Quevedo J, Medina JH, Izquierdo I. Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. Braz J Med Biol Res. 1997 Feb;30(2):235-40.

Zarrindast MR, Shafaghi B. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on acquisition of passive avoidance learning. Eur J Pharmacol. 1994;256(3):233-9.

ZeZula J, Freissmuth M. The A2A-adenosine receptor: a GPCR with unique features? Br J Pharmacol. 2008; 153 (Suppl 1): S184-S190.

Zhou SJ, Zhu ME, Shu D, Du XP, Song XH, Wang XT, Zheng RY, Cai XH, Chen JF, He JC. Preferential enhancement of working memory in mice lacking adenosine A2A receptors. Brain Res. 2009; 1303: 74-83.