

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Intervenções no sistema adenosinérgico: avaliação de aspectos neuroquímicos,
locomotores e nociceptivos**

Rosane Souza da Silva

Orientadora: Dra. Carla Denise Bonan

Co-Orientador: Dr. Diogo R. Lara

Departamento de Bioquímica

Tese apresentada para ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
como requisito parcial para a obtenção do grau de DOUTOR em Ciências Biológicas:

Bioquímica

Porto Alegre, Setembro de 2005

Este trabalho é dedicado com todo orgulho e carinho aos meus Mestres

Carla Denise Bonan e Renato Dutra Dias

AGRADECIMENTOS

É incrível como o ser humano pode ser, e é, cooperativo. Desta forma, este trabalho não poderia ter resultado sem o auxílio de muitas pessoas, as quais agradeço com todo o carinho:

À Carla , minha querida orientadora, colega e amiga por apostar e apoiar minha carreira científica.

Ao incrível Prof. Renato, não só pelo apoio incondicional, mas por fazer do estudo da Bioquímica algo apaixonante, estimulando todos os que com ele convivem.

À Alessandra pela recepção ao laboratório, pelo auxílio em vários experimentos e discussões e, principalmente, pela amizade que cultivamos.

À minha querida amiga Carina que mesmo em Santa Catarina me apoia e me incentiva com a mesma sinceridade e doçura de sempre.

À Giana pelo companheirismo e pela amizade desde os tempos do mestrado.

Ao Anselmo e à Elisa, bolsistas de iniciação científica, que me auxiliaram com muita dedicação.

Ao Diogo Lara pelo apoio para a realização desta tese.

À Iraci por apoiar e auxiliar o trabalho desenvolvido nesta tese.

Aos meus colegas de laboratório e parceiros de república, Elizandra (Bitcho) e Jean, por suportarem as variações de humor e estenderem a mão e oferecerem o ombro quando necessário.

Aos professores Ana e Sarkis, por disponibilizarem o espaço para realização deste trabalho, a atenção e, principalmente, suas experiências profissionais.

Aos colegas dos laboratórios 22 e 24 pelos momentos de aprendizado e pelo apoio.

Aos colegas do laboratório 26, especialmente os amigos Ricardo, Débora e Vanessa.

Aos colegas, Maria da Graça, Maurício, Ghisolfi, Mário, Eduardo, Carol, Kelly, Dênis, Marcelo e Giovana do Laboratório de Pesquisa Bioquímica da PUCRS, por tornar o ambiente de trabalho um local de crescimento pessoal e profissional e, principalmente, por demonstrar que a cooperação é a arma mais forte que um grupo de trabalho pode ter.

Aos meus amigos Andrés, Olavo e Vanessa, por todas as vezes que conseguiram me tirar de casa no período de realização da tese.

Às minhas amigas, Ale, Gabriela, Lisi, Patrícia e Eliane, pela empolgação e pelas conversas produtivas (outras nem tanto) desde a graduação.

Ao Alexandre, por demonstrar a cada dia a pessoa maravilhosa que é e pela ajuda incondicional e carinhosa para finalizar esta tese.

Agradeço a toda a minha família, em especial aos meus pais Elton e Beatriz, meus irmãos Marco, Silvana, Elton, César, Carlos e Susana pelo incentivo e acompanhamento.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos nos primeiros dois anos de curso.

APRESENTAÇÃO

Esta tese está subdividida em cinco partes. A primeira parte refere-se à INTRODUÇÃO, onde encontra-se uma revisão bibliográfica atualizada sobre o assunto estudado, bem como os objetivos geral e específicos deste estudo.

A segunda parte refere-se aos RESULTADOS, os quais são apresentados na forma de quatro artigos científicos. Dois destes artigos estão publicados e dois foram submetidos a apreciação da comissão editorial de periódicos científicos.

A terceira parte refere-se à DISCUSSÃO, onde encontra-se um exame dos resultados obtidos integrados aos já existentes na literatura científica. A quarta parte refere-se ao levantamento das CONCLUSÕES GERAIS obtidas neste trabalho. As citações bibliográficas referidas nas partes I e III encontram-se na quinta parte REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. O Sistema Adenosinérgico.....	1
I.2. Neuromodulação Adenosinérgica.....	13
I.2.1. Modulação Adenosinérgica sobre o Desenvolvimento Neural.....	17
I.2.2. Modulação Adenosinérgica sobre o Controle Motor.....	20
I.2.3. Modulação Adenosinérgica sobre a Nocicepção.....	23
I.3. Objetivos.....	28
I.3.1. Objetivo Geral.....	28
I.3.2. Objetivos Específicos.....	28
II. RESULTADOS	31
II.1. CAPÍTULO 1 - <u>Da Silva, R.S</u> ; Bruno, A. N; Battastini, A. M. O; Sarkis, J. J. F.; Lara, D. R.; Bonan, C. D. Acute Caffeine Treatment Increases Extracellular Nucleotide Hydrolysis from Rat Striatal and Hippocampal Synaptosomes . Publicado no periódico Neurochemical Research, Vol. 28 (8): 1273–1278, 2003.....	31

II.2. CAPÍTULO 2 - <u>Da Silva, R.S</u> ; Hoffman, A.; Souza, D. O.; Lara, D. R.; Bonan, C. D. Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in Young rats. Publicado no periódico European Journal of Pharmacology, 509: 155–159, 2005.....	38
II.3. CAPÍTULO 3 - <u>Da Silva, R. S.</u> ; Tonial, E. M.; Dalmaz, C.; Torres, I. L. da S.; Lara, D. R.; Bonan, C. D. Changes in the nociceptive response of rats submitted to long-term caffeine intake. Submetido ao Periódico Pharmacology Biochemistry and Behavior.....	44
II.4. CAPÍTULO 4 - <u>Da Silva, R.S.</u> ; Silveira, V. G. da; Tonial, E. M.; Battastini, A. M. O.; Sarkis, J. J. F.; Lara, D. R.; Bonan, C. D. Effects of maternal caffeine intake on nucleotides and acetylcholine degradation in hippocampus of neonate rats. Submetido ao periódico Brain Research Bulletin.....	66
III. DISCUSSÃO	85
IV. CONCLUSÕES GERAIS	94
V. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	98

RESUMO

Intervenções no sistema adenosinérgico: avaliação de aspectos neuroquímicos, locomotores e nociceptivos.

A adenosina está presente em todos os tipos celulares exercendo um papel homeostático. Em sistema nervoso central e periférico seu papel neuromodulador é observado. A presença de adenosina no meio extracelular permite a ativação de receptores adenosinérgicos específicos, classificados em: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. A ativação dos receptores A₁ e A_{2A}, receptores de alta afinidade, está diretamente envolvida com o papel neuromodulador, visto que a sua ativação produz inibição e facilitação da liberação de neurotransmissores, respectivamente. A seleção de qual receptor será ativado, visto que exibem co-expressão em muitas regiões neurais, pode ser feita de acordo com os sítios de liberação ou produção de adenosina extracelular. Desta forma, receptores A₁ seriam preferencialmente ativados pela adenosina liberada através dos transportadores bidirecionais de nucleosídeos e os receptores A_{2A} preferencialmente ativados pela adenosina proveniente da degradação do ATP realizada por uma cascata enzimática. A hidrólise de ATP a adenosina é realizada pelas enzimas ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases e ecto-5'-nucleotidase. Em ratos, a ativação do sistema adenosinérgico exerce seus efeitos neuromoduladores desde fases iniciais de desenvolvimento embrionário, alcançando o padrão adulto mesmo antes do nascimento. A ativação de receptores de adenosina na fase fetal e neonatal foi demonstrada ter como consequência o retardo no desenvolvimento global dos animais, bem como, ventriculomegalia e perda de massa cerebral branca. Esta informação levanta a questão da suscetibilidade do cérebro imaturo a certas drogas, tais como a cafeína. A cafeína é uma metilxantina com efeitos estimulantes, a qual exibe como base para seus efeitos o bloqueio inespecífico dos receptores de adenosina. No presente estudo, avaliou-se o efeito da administração de cafeína em diversos parâmetros. A administração aguda de cafeína, mas não a crônica, em ratos adultos foi capaz de alterar significativamente as atividades de hidrólise de ATP no hipocampo e de ADP no estriado. Este resultado poderia estar relacionado com a capacidade plástica do sistema adenosinérgico em restabelecer seu tônus em ratos adultos tratados cronicamente com cafeína. Além disto, verificou-se que a ação direta da cafeína afetou a produção de adenosina. A administração crônica de cafeína na água de beber de ratas mães durante a fase gestacional e lactacional alterou o padrão de hiperlocomoção induzido por MK-801, um antagonista de receptores NMDA glutamatérgicos, nos ratos filhotes aos 21 dias de vida, mesmo quando o acesso a cafeína foi retirado sete dias antes do teste. Além disto, o mesmo tratamento não alterou o limiar de dor de filhotes aos 14 e 50 dias de vida, bem como a analgesia induzida nestes animais aos 50 dias. Entretanto, quando os animais ainda recebiam cafeína no dia do teste, foi observado efeito analgésico somente nos ratos de 14 dias. A análise dos efeitos do tratamento sobre a degradação de acetilcolina e sobre a degradação de nucleotídeos em hipocampo de ratos jovens demonstrou que ambas as atividades foram alteradas. O conjunto de resultados desta tese indica que a intervenção no sistema adenosinérgico durante as fases gestacional e neonatal é capaz de desenvolver adaptações, provavelmente relacionadas ao aumento da expressão de receptores para adenosina, na tentativa de restabelecer o controle modulador adenosinérgico, considerada a importância dos sistemas avaliados para a manutenção do organismo.

ABSTRACT

Interventions on adenosinergic system: evaluation of neurochemical, locomotor and nociceptive aspects

Adenosine is a natural component of all cell types exhibiting a homeostatic role. In central and peripheral nervous systems, adenosine plays a neuromodulatory role. The presence of adenosine in extracellular milieu permits the activation of specific adenosinergic receptor (A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3). The activation of adenosine A_1 and A_{2A} receptor, which are high affinity receptors, is directly related with neuromodulation, since that promotes inhibition and facilitation of neurotransmitter release, respectively. Considering the co-expression of these receptors, it has been proposed that the differential activation of adenosine receptor is related to the sites of adenosine release or formation. Thus, A_1 receptors are preferentially activated by adenosine release from nucleoside bi-directional transporter and A_{2A} receptors by adenosine from ATP degradation promoted by an enzymatic cascade. The hydrolysis of ATP to adenosine is performed by ectonucleoside triphosphato diphosphohydrolases and an ecto-5'-nucleotidase. In rats, the activation of adenosinergic system exerts a modulator role since early phases of development, reaching the pattern of adult brain before the birth. Adenosine receptor activation in embryonic and neonatal phases has been demonstrated to produce impairment of global animal development, ventriculomegaly and loss of white brain matter. This information raises the question about the susceptibility of immature brain towards some drugs, such as caffeine. Caffeine is a methylxanthine that exhibits stimulant effects, which are based on unspecific blockade of adenosine receptors. In the present study, it has been evaluated the effects of caffeine administration on some parameters. Acute administration of caffeine on adult rats, but not chronic administration, was able to alter the ATP and ADP hydrolysis from hippocampus and striatum, respectively. This result can be related to the plasticity exhibited by neural tissues in order to reestablish the adenosinergic tonus in adult rats chronically treated with caffeine. Moreover, it has been verified a direct action of caffeine upon the adenosine formation. Chronic administration of caffeine in the drink water of rat dams during gestational and lactational phases altered the pattern of MK-801-induced hyperlocomotion, in 21 days-old litters. These effects are persistent to the deprivation of caffeine seven days before the experiment. The same treatment did not alter the pain threshold of litters at 14 and 50 days of age, as well as the stress-induced analgesia in these animals at 50 days of age. However, only animals at 14 days of age that received caffeine until the day of test exhibit analgesic response. The analysis of this treatment on acetylcholine and nucleotide degradation from hippocampus of young animals showed alteration of these enzymatic activities. This set of results indicate that intervention on adenosinergic system during gestational and neonatal phases is able to promote adaptations, probably related to up-regulation of adenosine receptors. These adaptations can reestablish the normal neuromodulatory control of adenosine, considering the relevance of the adenosinergic control on the systems evaluated to the organism maintenance.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA I.1. Representação esquemática da capacidade das vias de metabolismo extracelular de adenosina (e ATP) em determinar qual o receptor será preferencialmente ativado em terminais nervosos hipocampais	2
FIGURA I.2. Topografia de membrana das ectonucleotidasas.....	5
FIGURA I.3. Diagrama esquemático de alguns mecanismos que podem estar envolvidos nas interações entre receptores adenosinérgicos (A ₁ , A ₂ , e A ₃) e outros neurotransmissores ou receptores de neuromoduladores em neurônios.....	11
CAPÍTULO 1	
FIGURA 1.1. Effect of acute caffeine treatment (30 mg/kg i.p) on ATP, ADP, and AMP hydrolysis from hippocampal (A) and striatal (B) synaptosomes...	34
FIGURA 1.2. Effect of chronic caffeine treatment (0.3 or 1 g/l in the drinking water, during 14 days) on the ATP, ADP, and AMP hydrolysis in hippocampal (A) and striatal (B) synaptosomes of rats.....	35
CAPÍTULO 2	
FIGURA 2.1. Effect of maternal caffeine intake on MK-801-induced hiperlocomotion in pups. (A): Locomotion in sets of 10 min. (B): Total locomotion during habituation and after MK-801 treatment.....	41
CAPÍTULO 3	
FIGURA 3.1. Effect of caffeine treatment on the basal nociceptive threshold. A: Young rats (P14). B: Adult rats (P50).....	63

FIGURA 3.2. Effect of caffeine treatment on the stress-induced analgesia.....	65
---	----

CAPÍTULO 4

FIGURA 4.1. Effects of caffeine maternal intake on hippocampal AChE activity of 7, 14 and 21 days old neonate rats.....	83
--	----

FIGURA 4.2. Effects of caffeine maternal intake on hippocampal nucleotidase activity of 7, 14 and 21 days old neonate rats. (A): ATP hydrolysis. (B): ADP hydrolysis. (C): AMP hydrolysis.....	84
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Agonistas e antagonistas específicos de receptores de adenosina..... 12

CAPÍTULO 1

TABELA 1.1. Caffeine consumption in chronic treatment..... 34

LISTA DE ABREVIATURAS

2CI-IB-MECA: 2-cloro- N^6 -(3-iodobenzil)-5'- N -metilcarbomoil) adenosina
3',5' AMPc- Adenosina 3',5', monofosfato cíclico
8-SPT: 8-(*p*-sulfofenil) teofilina
AB-MECA: N^6 -4 aminobenziladenosina-5'- N -metiluronamida
ABOPX: 3-(4-aminobenzil)-8-(4-oxiacetato)fenil-1-propilxantina
ADAC: N^6 - [4-[(2-aminoetil)-amino]carbonilmetil]fenil]adenosina]
ADP – adenosina 5'-difosfato
AMP – adenosina 5'-monofosfato
APEC: 2-[(2-aminoetilamino) carboniletilfeniletilamino] –5'- N -etilcarboxamidoadenosina
ATP – adenosina 5'-trifosfato
CCPA: 2-cloro- N^6 -ciclopentil-adenosina
CGS21680: 2-[*p*-(2-carbonil-etil)-feniletilamino]-5'- N -etilcarboxamidoadenosina
CHA: N^6 -ciclohexil-adenosina
CPA: N^6 -ciclopentil-adenosina
CPT: 8-ciclopentil-1,3-dimetilxantina
CSC: 8-(3-cloroestiril) cafeína
CV1808: 2-fenilamidoadenosina
DCCA: 1- deaza-2-cloro- N^6 -ciclopentil-adenosina
DMPA: N^6 -[2(3,5-dimetoxifenil)-2-(2-metilfenil)etil]-adenosina
DMPX: 3,7-dimetil-1-propagilxantina
DPCPX: 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina
D-PIA: D-fenilisopropil adenosina
ENX: 1,3-dipropil-8-[2-(5,6-epoxi) norbornil] xantina
FK453: (+) – (R)-[(E)-3-(2-fenilpirazolo [1,5- α] piridin-3-il) acriloil]-2-piperidine etanol
HE-NECA: 2-hexil-5'- N -etilcarboxiamidoadenosina
IB-MECA: N^6 -3-iodobenzil-adenosina-5'- N -metiluranamida
KF17837: 1,3-dipropil-8-(3,4-dimetoxiestiril)-7-metilxantina
KFM19: [(\pm)-8-(3-oxociclopentil)-1,3-dipropilxantina]
KW-3902: 8-noradamant-3-il-1,3-dipropilxantina
KW-6002: (E)-1,3-Dietil-8-(3,4-dimetoxi-estiril)-7-metilxantina
MK-801: Maleato de Dizolcipina
MRS 1220: 9-cloro-2-(2-furil)-5-[(fenilacetil)amino] [1,2,4] triazolo [1,5-*c*]quinazolina
MRS 1334: 3-etil-5-(4-nitrobenzil)-2-metil-4-feniletinil-6-fenil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato
MRS 1353: 3-etil-5-[4-[(2,2,2-tricloroetoxy) carbonil]-benzil]-2-metil-4-feniletinil-6-fenil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato
MSX-2: 3-(3-hidroxiopropil)-8-(3-metoxiestiril)-7-metil-1-propargilxantina
MSX-3: 3-(3-hidroxiopropil)-8-(*m*-metoxiestiril)-7-metil-1-propargilxantina
NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NBTI: Nitrobenziltioinosina

NMN: Nicotinamida adenina mononucleotídeo
PSB-1115: 1-propil-8-(*p*-sulfofenil)xantina
PSB-50: 8-(*p*-bromofenil)-1-propargilxantina
PSB-53: ácido benzoico 4-(1-butilxantina-8-il)
PSB-55: 8-{4-[2-(4-benzilpiperazina-1-il)-2-oxo-etoxi]fenil}-1 butilxantina
R-PIA: (R) *N*⁶-fenilisopropiladenosina
SCH58261: 5-amino-7-(2-feniletil)-2 (2-furil)-pirazolo [4,3-*e*]- 1,2,4-triazolo [1,5-*c*]
pirimidina
SKF 38393: (±)-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-(1H)-3-benzazepina-7,8-diol HCl
WRC-0470: 2-cicloexilmetilideniidrazinoadenosina
WRC0571: 8-(*N*-metilisopropil) amino-*N*⁶-(5'-endohidroxi-endonorbonil)-9-
metiladenina
XAC: 8-[4[[[(-aminoetil)amino]carbonil]metil]oxi]fenil]1,3-dipropilxantina
ZM241385: 4-(2-[7-amino-2-(2-furil)] 1, 2, 4 - triazolo [2,3-*a*] [1,3,5] triazin-5-
ilamino]etil)fenol

I. INTRODUÇÃO

I.1 O Sistema Adenosinérgico

A adenosina é um nucleosídeo presente nos meios intra e extracelular que possui sua disponibilidade altamente controlada devido ao papel neuromodulador e homeostático que exerce (Cunha, 2001a). As concentrações intracelulares de adenosina encontram-se na ordem de 10 a 50 nM, enquanto que as concentrações extracelulares encontradas na fenda sináptica são de aproximadamente 0,5 a 4 μ M (Cunha, 2001a, 2005). A produção intracelular de adenosina resulta de duas principais fontes: (1) a clivagem da S-adenosilhomocisteína pela enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase (EC 3.3.1.1) (Dunwiddie e Masino, 2001); e (2) a degradação do nucleotídeo monofosfatado AMP pela enzima 5'- nucleotidase (EC 3.1.3.5) (Brundege e Dunwiddie, 1997). Alterações na concentração intracelular de adenosina influenciam sua concentração extracelular, devido à presença de transportadores equilibrativos e bidirecionais específicos para a adenosina. Estes transportadores são classificados em dois tipos, de acordo com a sensibilidade ao inibidor nitrobenziltioinosina (NBTI) (Wang et al., 1997; Dhalla et al., 2001). Devido à alta afinidade da enzima adenosina quinase (EC 2.7.1.20) pela adenosina, sua concentração intracelular é relativamente baixa, favorecendo o influxo de adenosina através destes transportadores (Brundege e Dunwiddie, 1997). Nas situações em que a concentração intracelular de adenosina aumenta, como por exemplo, durante uma isquemia, a adenosina chega ao meio extracelular através destes transportadores (Parkinson et al., 2000). Além da adenosina proveniente dos

transportadores, existe uma importante cascata enzimática que produz adenosina a partir do AMP (Figura I.1).

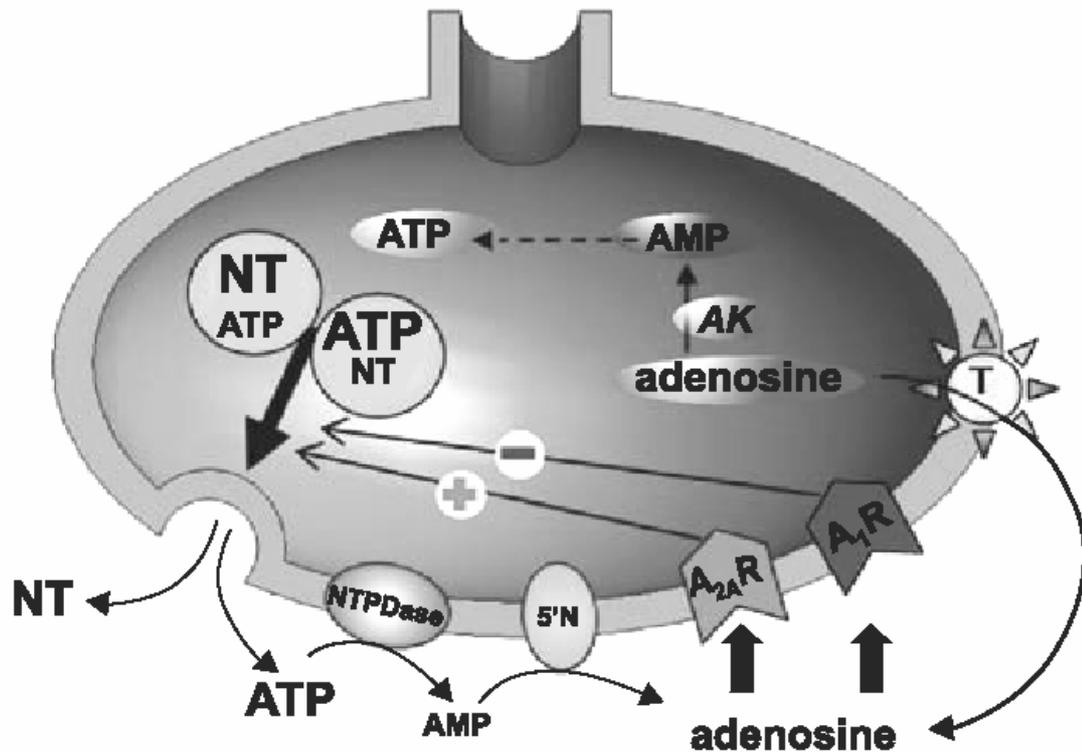


Figura I.1: Representação esquemática da capacidade das vias de metabolismo extracelular de adenosina (e ATP) em determinar qual o receptor será preferencialmente ativado em terminais nervosos hipocampais. NT: Neurotransmissores; AK: Adenosina quinase; NTPDase: Nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase; 5'N: 5'-nucleotidase; T: transportadores bidirecionais de nucleosídeos. [Cunha, R. A. (2005). Neuroprotection by adenosine in the brain: From A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade. *Purinergic Signalling* 1: 111-134.].

O ATP é a fonte primária de substrato para esta cascata enzimática de produção de adenosina. A maioria das terminações nervosas pode liberar mais de um tipo de

neurotransmissor, sendo o ATP um destes (Burnstock, 1999). Evidências de que o ATP atua como neurotransmissor incluem o fato deste ser sintetizado e armazenado nos terminais, bem como sua liberação após estimulação destes terminais nervosos (Ralevic e Burnstock, 1998). O ATP exerce seus efeitos através da ativação de receptores específicos denominados P2Y (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14}) e P2X (P2X₁₋₇), os quais são receptores metabotrópicos e ionotrópicos, respectivamente (Burnstock, 2004).

O ATP também é co-liberado com diversos neurotransmissores (para revisão ver Burnstock, 1999). Em terminais nervosos simpáticos é liberado com noradrenalina e neuropeptídeo Y. Em sinapses do sistema parasimpático é liberado com acetilcolina e polipeptídeos vaso-ativos. Em terminais nervosos não-colinérgicos e não-adrenérgicos presentes no intestino delgado, é liberado com óxido nítrico e polipeptídeos vaso-ativos. Em neurônios sensorio-motores é liberado com o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e com a substância P. Na retina é liberado com o ácido γ -aminobutírico (GABA) e no sistema nervoso central (SNC) com glutamato.

Nucleotídeos - 5'- trifosfatados e difosfatados, como o ATP e o ADP, podem ter seus níveis extracelulares controlados pela ação de várias enzimas que estão localizadas na superfície celular ou estão na forma solúvel (Zimmermann, 2001). Estas enzimas têm sido clonadas, caracterizadas funcionalmente e constituem as famílias de enzimas ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDase), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPP) e fosfatase alcalina (Zimmermann, 2001). Nucleotídeos - 5'-monofosfatados sofrem a ação da ecto - 5'- nucleotidase, sendo este o passo limitante para a formação extracelular de adenosina através das ecto-nucleotidases (Zimmermann, 1996; Cunha, 2001a) (Figura I.2).

As E-NTPDases hidrolisam nucleotídeos púricos e pirimídicos, tri e difosfatados na dependência de cátions divalentes (Zimmermann, 2001). Estas enzimas são expressas

em uma variedade de tecidos acompanhando a distribuição tecidual dos receptores purinérgicos (P2), sendo importantes para o controle da ativação destes receptores pelos seus ligantes (Zimmermann, 2001; Kukulski et al., 2005). As E-NTPDases constituem a principal família de ecto-nucleotidases, sendo subdividida em oito enzimas diferenciadas pelas variações quanto à afinidade pelo substrato, a qual pode ser revelada pela razão de hidrólise dos nucleotídeos. As NTPDases 1, 2, 3 e 8 possuem dois domínios transmembrana com o sítio ativo voltado para o meio extracelular (Zimmermann, 2001; Bigonnesse et al., 2004). As NTPDases 4, 5, 6 e 7 são ancoradas em membranas de organelas intracelulares por um ou dois domínios transmembrana e com o sítio catalítico voltado para o lúmen das organelas (Braun et al., 2000a; Biederbick et al., 2000; Shi et al., 2001; Zimmermann, 2001). A presença de ecto-nucleotidases em tecido neural de mamíferos é reconhecida em neuroblastomas, neurônios do córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, micróglia, astrócitos e frações sinaptossomais corticais, bem como em células endoteliais e musculares lisas da vasculatura cerebral (Battastini et al., 1991; Zimmermann, 1996; Marcus et al., 1997; Wang e Guidotti, 1998; Braun et al., 2000b; Joseph et al., 2003) A co-expressão da ecto-ATP difosfohidrolase (NTPDase 1) e da ecto-ATPase (NTPDase 2) é encontrada em preparações de músculo cardíaco, rins, baço, pulmões, músculo esquelético e cérebro de ratos (Kegel et al., 1997).

A família das E-NPPs contém três membros (NPP1, 2 e 3), que exibem atividade de fosfodiesterase alcalina e nucleotídeo pirofosfatase, hidrolisando uma variedade de substratos que incluem 3',5'-AMPc, ATP, ADP, o NAD, NMN e diadenosina polifosfato (A_p_nA) (Zimmermann, 2001). As fosfatases alcalinas possuem uma ampla especificidade por substratos, hidrolisando nucleotídeos mono, di e trifosfatados, bem

como uma variedade de compostos orgânicos fosfatados e o pirofosfato inorgânico (Zimmermann, 1996; Zimmermann, 2001).

As 5'- nucleotidasas constituem uma família de enzimas com distribuição tecidual ampla e com capacidade de produzir nucleosídeos a partir de nucleotídeos - 5'-monofosfatados (Bianchi e Spsychala, 2003). Diferentes distribuições sub-celulares são encontradas para os membros da família das 5'- nucleotidasas, existindo formas solúveis e formas ancoradas à membrana (Bianchi e Spsychala, 2003). A participação da ecto - 5'- nucleotidase (EC 3.1.3.5) na via das ectonucleotidasas exerce um papel modulador sobre a produção de adenosina extracelular, sendo a enzima marca-passo desta cascata enzimática (Zimmermann, 1996; Cunha, 2001a).

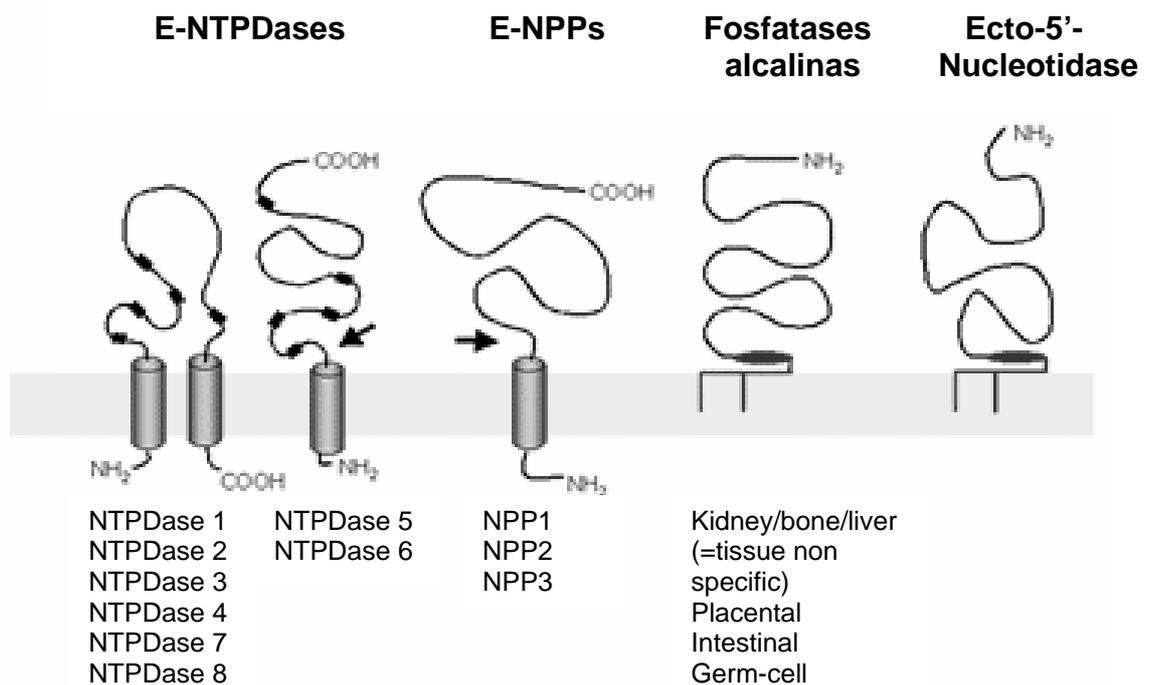


FIGURA I.2. Topografia de membrana das ectonucleotidasas [Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidasas: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. Drug Development Research 52: 44-56 (modificado)].

A taxa de produção extracelular de adenosina promovida pela ecto-5'-nucleotidase é fortemente inibida pelas concentrações de ATP e/ou ADP (Cunha, 2001a). Desta forma, uma pequena liberação de ATP promove uma produção linear de adenosina e uma liberação aumentada de ATP promove o acúmulo de AMP, proporcionando um aumento abrupto de adenosina extracelular quando os níveis de ATP diminuem (Cunha, 2001a; Latini e Pedata, 2001).

A concentração extracelular de adenosina é um fator determinante dos efeitos neuromoduladores desta molécula. A adenosina exerce seus efeitos através da ativação de receptores de membrana específicos, denominados receptores purinérgicos P1 (Burnstock, 1972). Existem quatro subtipos de receptores P1, denominados A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, os quais são diferentes quanto à afinidade pela adenosina, estruturas moleculares, distribuição tecidual e perfil farmacológico (Dunwiddie e Masino, 2001; Fredholm et al., 2001). Os receptores A₁ e A_{2A} apresentam alta afinidade pela adenosina, enquanto os receptores A_{2B} e A₃ são de baixa afinidade (Ribeiro et al., 2003). Todos os receptores P1 são acoplados a proteínas G e exibem sete domínios transmembrana formados por aminoácidos hidrofóbicos (Ralevic e Burnstock, 1998). A porção N-terminal é voltada para o meio extracelular, enquanto a porção C-terminal está voltada para o citosol (Ralevic e Burnstock, 1998; Fredholm et al., 2001).

Dentre os receptores adenosinérgicos, os receptores A₁ exibem a maior abundância no sistema nervoso central, com alta expressão no córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, tálamo, tronco cerebral e medula espinhal (Fredholm et al., 2001). Adicionalmente, este receptor é amplamente expresso em tecidos periféricos tais como vasos deferentes, testículos, tecido adiposo, estômago, rins, hipófise, adrenais, coração, aorta, fígado, olhos e bexiga (Ralevic e Burnstock, 1998). Os receptores adenosinérgicos do tipo A₁ possuem alta afinidade pela adenosina, exibindo um K_d de,

aproximadamente, 70 nM de adenosina (Dunwiddie e Masino, 2001). A localização celular destes receptores é pré-sináptica, pós-sináptica e no axônio (Swanson et al., 1995; Rebola et al., 2003).

A ativação dos receptores adenosinérgicos do tipo A_1 promove efeitos inibitórios na neurotransmissão. A mais conhecida das vias de sinalização dos receptores A_1 é a inibição da enzima adenilato ciclase (EC 4.6.1.1) através da ativação da proteína G inibitória (G_i/G_o) (Freissmuth et al., 1991a; Freissmuth et al., 1991b; Munshi et al., 1991). Esta inibição proporciona a diminuição das concentrações do segundo mensageiro AMPc, inibindo as vias dependentes desta molécula sinalizadora (Van Calker et al, 1978; Londos et al., 1980). Além disso, a hiperpolarização neuronal por ativação dos canais de K^+ pré-sinápticos e a inibição do influxo de cálcio parecem ser os outros mecanismos importantes de inibição da liberação de neurotransmissores por ativação dos receptores A_1 (Trussell e Jackson, 1985; Pan et al., 1995; Scholz e Miller, 1996). A inibição das correntes de cálcio após a ativação dos receptores A_1 de adenosina, principalmente através dos canais de cálcio do tipo N, tem sido descrita em diversos tipos celulares, tais como, neurônios ganglionares do ramo dorsal (Dolphin et al., 1986), neurônios hipocámpais (Scholz e Miller, 1991), neurônios das regiões CA1 e CA3 do hipocampo (Mogul et al., 1993; Wu e Saggau, 1994). Em células de cérebro de ratos, o acoplamento de receptores A_1 a canais de potássio K_{ATP} também tem sido demonstrado, o que está relacionado com redução da duração do potencial de ação, bem como da vasodilatação (Yaar et al., 2005). A fosfolipase C também tem sido descrita como componente do mecanismo de inibição exercido pelo receptor A_1 (Megson et al., 1995). O principal sistema de neurotransmissão afetado pela inibição adenosinérgica é o sistema glutamatérgico, porém os sistemas colinérgico, dopaminérgico e

serotoninérgico podem também ser modulados por este nucleosídeo (Dunwiddie e Masino, 2001).

Os receptores A_{2A} são também considerados receptores de alta afinidade, visto que possuem um K_d de, aproximadamente, 150 nM de adenosina (Dunwiddie e Masino, 2001). A distribuição tecidual destes receptores é bastante restrita no sistema nervoso central, ocorrendo basicamente no estriado, núcleo accumbens e tubérculo olfatório (Ongini e Fredholm, 1996). Sua ocorrência nos tecidos periféricos inclui células do sistema imune, olhos, músculo esquelético, coração, útero, bexiga, plaquetas e células endoteliais (Dixon et al., 1996; Peterfreund et al., 1996). Em menor escala, estes receptores também estão expressos no intestino delgado, rins, baço, estômago, testículos, pele e fígado (Dixon et al., 1996; Peterfreund et al., 1996). Rebola et al. (2005) ao avaliarem a distribuição subcelular dos receptores A_{2A} verificaram que as sinapses hipocâmpais expressam estes receptores com maior abundância na pré-sinapse e preparações estriatais expressam estes receptores em maior número na região pós-sináptica.

A ativação dos receptores adenosinérgicos do tipo A_{2A} desencadeia uma resposta antagônica àquela dos receptores do tipo A_1 pela ativação da proteína G estimulatória (G_s), a qual aumenta os níveis intracelulares de AMPc (Correia-de-Sá e Ribeiro, 1994; Latini et al., 1996; Kessey e Mogul, 1998). A facilitação da liberação de neurotransmissores parece ocorrer através da potenciação de canais de cálcio tipo P e N e da ativação de proteína quinase A (Gubitz et al., 1996; Kessey e Mogul, 1998). Mecanismos de transdução de sinal independentes de AMPc, como a ativação da fosfolipase C, parecem estar envolvidos na sinalização em neurônios gabaérgicos e colinérgicos do estriado (Kirk e Richardson, 1995; Gubitz et al., 1996).

Dois outros receptores adenosinérgicos são descritos, o A_{2B} e o A_3 , os quais possuem uma baixa afinidade pela adenosina, exibindo um K_d de, aproximadamente, 5100 nM e 6500 nM, respectivamente (Brundege e Dunwiddie, 1997; Dunwiddie e Masino, 2001). Devido à expressão difusa e ao menor número de ferramentas farmacológicas específicas para estes receptores, o conhecimento sobre o efeito da ativação ou da inativação deles é menos documentado na literatura. Os receptores do tipo A_{2B} possuem baixa expressão no SNC, nos pulmões, vasos deferentes e hipófise (Rees et al., 2003; Rosi et al., 2003; Gessi et al., 2005; Zhong et al., 2005). Uma alta expressão deste receptor é encontrada no intestino grosso e bexiga (Fredholm et al., 2001; Yaar et al., 2005). Assim como os receptores A_{2A} , os receptores A_{2B} são acoplados a proteínas G estimulatórias (Gs), promovendo o aumento dos níveis de AMPc (Brundege e Dunwiddie, 1997). Existem muitas evidências sugerindo o envolvimento da fosfolipase C como mediadora de muitas das respostas à ativação dos receptores A_{2B} (Yaar, et al, 2005). A ativação destes receptores promove, em neurônios hipocámpais e do tronco cerebral, a ativação de correntes de cálcio por meio dos canais do tipo P (Mogul et al., 1993). Devido à baixa afinidade destes receptores pela adenosina e seu envolvimento com a reação inflamatória, Fredholm e Altiok (1994) postularam que estes receptores podem mediar efeitos neuroprotetores, quando os níveis extracelulares de adenosina aumentam.

Os receptores A_3 foram os últimos receptores adenosinérgicos descritos, sendo expressos de forma moderada no cerebelo e hipocampo e com baixa expressão no restante do cérebro (Fredholm et al., 2001). Outros órgãos, tais como, testículos, fígado, útero, pulmões, rins, placenta, coração, jejuno, bexiga e baço também expressam os receptores A_3 (Ralevic e Burnstock, 1998). A ativação de receptores A_3 inibe a produção de AMPc, através da ação de uma proteína G inibitória (Ralevic e Burnstock,

1998). Além disso, a ativação da fosfolipase C também é descrita em cérebro de ratos após a ativação deste receptor (Brundege e Dunwiddie, 1997; Yaar et al., 2005). Os efeitos biológicos da ativação dos receptores A₃ ainda são alvo de investigação, porém sabe-se que estes receptores estão envolvidos no processo inflamatório (Ramkumar et al., 1993). O processo de apoptose em algumas células de humanos parece necessitar de ativação crônica dos receptores A₃ (Ralevic e Burnstock, 1998). Entretanto, o antagonismo destes receptores também induz apoptose, efeito revertido pelo agonista CI-IB-MECA em baixas concentrações, sugerindo que a ativação dos receptores A₃ pode promover proteção celular (Yao et al., 1997). Adicionalmente, o receptor A₃ pode desempenhar um papel funcional como modulador da potenciação de longa duração (LTP, do inglês “*long-term potentiation*”) e da depressão de longa duração (LTD, do inglês “*long-term depression*”) no hipocampo (Costenla et al., 2001).

Uma importante forma de análise do sistema adenosinérgico e de sua interação com sistemas de neurotransmissão (Figura I.3) baseia-se na utilização de agonistas e antagonistas dos receptores P1. Desde a caracterização dos receptores de adenosina de alta afinidade, A₁ e A_{2A}, um grande número de agonistas e antagonistas destes receptores foram desenvolvidos, com o objetivo de realizar intervenções que possam ser utilizadas como ferramentas terapêuticas em diversas patofisiologias. Após a descoberta dos receptores A_{2B} e A₃, a especificidade dos ligantes previamente desenvolvidos foi reavaliada para os diferentes receptores. Agonistas e antagonistas seletivos para estes receptores auxiliam na determinação de quais receptores adenosinérgicos, especificamente, estão envolvidos nos mecanismos de modulação exercidos pela ativação destes receptores (Tabela 1).

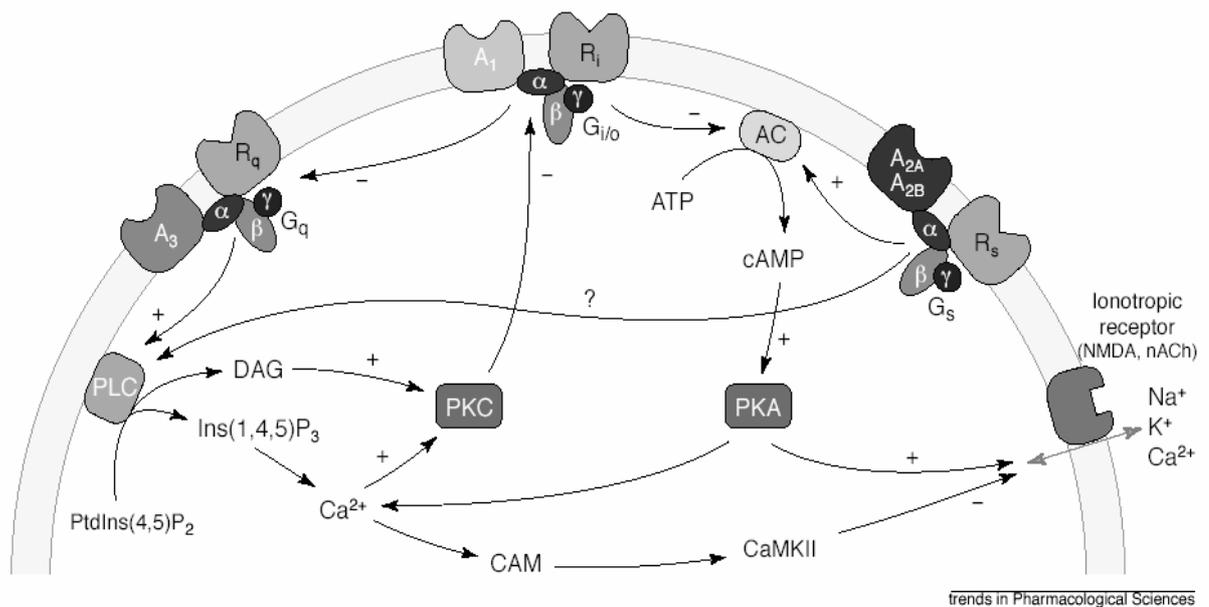


Figura I.3: Diagrama esquemático de alguns mecanismos que podem estar envolvidos nas interações entre receptores adenosinérgicos (A₁, A₂, e A₃) e receptores de outros neuromoduladores ou neurotransmissores em neurônios. R_i: Receptores acoplados negativamente a Adenilato ciclase; R_s: Receptores acoplados positivamente a Adenilato ciclase; R_q: Receptores acoplados positivamente a Fosfolipase C. [Sebastião e Ribeiro. (2000). Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *TiPS* 21(9): 341-436.].

TABELA 1. Agonistas e antagonistas específicos de receptores de adenosina

	Subtipos de Receptores Adenosinérgicos			
	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
Agonistas	CPA ⁴ CCPA ⁴ CHA ⁴ DCCA ⁵ R-PIA ⁴	APEC ⁴ CGS21680 ⁴ CV1808 ⁴ DMPA ⁴ HE-NECA ⁴ WRC-0470 ⁴	-	AB-MECA ³ IB-MECA ⁴ 2CI-IB-MECA ⁴
Antagonistas	CPT ² DPCPX ⁴ XAC ⁴ KW-3902 ⁴ ENX ⁴ KFM19 ⁴ FK453 ⁴ WRC0571 ⁴	CSC ⁴ DMPX ⁵ KF17837 ⁴ KW-6002 ⁵ MSX-2 ⁵ MSX-3 ² SCH58261 ⁴ ZM241385 ⁴	PSB-1115 ¹ PSB-50 ¹ PSB-53 ¹ PSB55 ¹ 8-SPT ¹ [³ H]DPCPX ³ [³ H]ZM 241385 ³ [³ H]ABOPX ³	MRS 1220 ³ MRS 1334 ³ MRS 1353 ³

¹Abo-Salem et al., 2004²Karcz-Kubicha et al., 2003³Koltz, 2000⁴Ralevic e Burnstock, 1998⁵Moreau e Huber, 1999

A cafeína e os seus derivados são os mais conhecidos antagonistas dos receptores P1. Uma especial importância da utilização de estudos clínicos, epidemiológicos e bioquímicos da ingestão de cafeína provém do seu expressivo consumo mundial e efeitos psicoestimulantes. A cafeína é uma xantina que bloqueia de forma não específica os receptores A₁, A_{2A} e A_{2B}, sendo ineficaz no bloqueio do subtipo A₃ (Fredholm et al., 1999). O receptor com maior afinidade pela cafeína é o subtipo A_{2A} (Kd = 8,1 e 2,4 µM para ratos e humanos, respectivamente), seguido pelos receptores A_{2B} (Kd = 17 e 13 µM para ratos e humanos, respectivamente) e A₁ (Kd = 20 e 12 µM para ratos e humanos, respectivamente) (Fredholm et al., 1999). O bloqueio destes receptores é alcançado com o consumo humano normal de cafeína, equivalente a duas ou três xícaras de café. Entretanto, a cafeína, em concentrações milimolares é capaz de inibir a enzima

fosfodiesterase, estimular a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, além de inibir receptores gabaérgicos (Fredholm et al., 1999).

I.2 Neuromodulação Adenosinérgica

A presença de diferentes receptores adenosinérgicos em um mesmo tipo celular levanta a questão da interação entre estes receptores. Em diferentes preparações de neurônios colinérgicos do estriado, e colinérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos e glutamatérgicos do hipocampo, e colinérgicos do córtex cerebral, foi demonstrada a co-existência de receptores A_1 e A_{2A} funcionais (Cunha, 2001a). A semelhante afinidade destes receptores pela adenosina, o acoplamento a proteínas G antagônicas e sua co-localização tornam extremamente importante a concentração local da adenosina (Sebastião e Ribeiro, 2000). A determinação do receptor a ser ativado nestas células que exibem co-existência destes receptores parece estar diretamente envolvida com a fonte de adenosina extracelular (Ribeiro et al., 2003). A ativação dos receptores A_{2A} é preferencialmente alcançada quando o aporte de adenosina extracelular resulta da ação das ecto-nucleotidases sobre os nucleotídeos liberados na fenda sináptica (Cunha et al., 1996; Ribeiro et al., 1996). A ativação de receptores A_1 é preferencialmente obtida pela liberação de adenosina através de seus transportadores específicos (Cunha, 2001a; Ribeiro et al., 2003).

Até o momento, existem poucos estudos sobre o papel biológico da interação entre os diferentes subtipos de receptores adenosinérgicos. Entretanto, em neurônios hipocámpais, a ativação de receptores A_{2A} atenua a inibição da transmissão sináptica exercida pela ativação de receptores A_1 , processo que envolve a proteína quinase C (Lopes et al., 1999). Além disso, na junção neuromuscular, a resposta inibitória à

ativação do receptor A_1 é aumentada na presença de antagonistas do receptor A_2 (Lopes et al., 1999; Sebastião e Ribeiro, 2000).

A neuromodulação exercida pela adenosina acontece, principalmente, via ativação de receptores de alta afinidade, A_1 e A_{2A} , porém um papel neuromodulador também tem sido atribuído ao receptor A_{2B} (Ribeiro et al., 2003; Rosi et al., 2003). A ação neuromodulatória adenosinérgica realiza-se através de interações receptor-receptor, e da sincronia ou falta de sincronia na ativação de receptores para neuropeptídeos, de receptores nicotínicos auto-facilitatórios, de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e de receptores metabotrópicos para glutamato (Ferre et al., 1997, Ribeiro, 1999, Sebastião e Ribeiro, 2000). A interação entre receptores adenosinérgicos e receptores ionotrópicos deve ocorrer através do grau de fosforilação destes receptores, enquanto que a interação com receptores metabotrópicos deve ocorrer ao nível de proteína G ou nos processos mediados por esta proteína (Ribeiro et al., 2003).

Um conhecimento considerável sobre a interação entre receptores de adenosina e receptores colinérgicos, dopaminérgicos e glutamatérgicos é encontrado na literatura (Ferre et al., 1991; Ginés et al., 2000; Ciruela et al., 2003). Evidências da interação entre receptores adenosinérgicos e glutamatérgicos resultam da potenciação do aumento nos níveis de AMPc induzidos por agonistas de receptores adenosinérgicos A_2 , após a ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu) (Cartmell et al., 1994). Os receptores glutamatérgicos do tipo $mGlu_{1\alpha}$ possuem um papel controverso em neuroproteção/neurodegeneração, o qual parece estar relacionado com a interação entre os receptores glutamatérgicos e adenosinérgicos (Ciruela et al., 2003). Uma interação de provável interesse farmacológico também é encontrada entre os receptores de adenosina A_{2A} e os receptores de glutamato $mGlu_5$ no estriado (Domenici et al., 2004). Macek e colaboradores (1998) demonstraram que a ativação de receptores A_3 e da proteína

quinase C é capaz de inibir receptores glutamatérgicos do tipo mGlu. A modulação adenosinérgica sobre o sistema de neurotransmissão glutamatérgica é de especial relevância, considerando que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, e que ele exibe toxicidade quando em altas concentrações (Olney, 1990).

A modulação purinérgica sobre a liberação de acetilcolina é bem estabelecida na junção neuromuscular e existem evidências desta modulação no sistema nervoso central (Ribeiro et al., 1996; Cunha e Ribeiro, 2000). Existe uma forte modulação adenosinérgica sobre a liberação de acetilcolina em neurônios colinérgicos ascendentes, que se projetam até o córtex e tálamo (Acquas et al, 2002). A co-liberação de ATP e acetilcolina e a posterior degradação do ATP até adenosina torna difícil distinguir se a adenosina e/ou o próprio ATP modulam a liberação de acetilcolina (Cunha e Ribeiro, 2000). Entretanto, na junção neuromuscular, em neurônios estriatais, corticais e hipocámpais, a ação inibitória e facilitatória da adenosina sobre a liberação de acetilcolina, através dos receptores A_1 e A_{2A} , respectivamente, foi demonstrada em diversas preparações destas estruturas (Cunha e Ribeiro, 2000). Em preparações sinaptossomais de córtex e de hipocampo de ratos, Cunha e colaboradores (1994) demonstraram que a liberação de acetilcolina em córtex é inibida por análogos de ATP, enquanto que no hipocampo a modulação é promovida pela adenosina.

Dentre as interações receptor-receptor encontradas entre receptores adenosinérgicos e receptores de outros sistemas de neurotransmissão, a interação receptores adenosinérgicos-dopaminérgicos é a mais bem detalhada na literatura científica. Uma interação antagônica entre receptores A_1/D_1 e receptores A_{2A}/D_2 é registrada principalmente na região do estriado (Fuxe et al., 1998; Rimondini et al., 1998). A co-localização destes receptores na região do estriado e *nucleus accumbens* é bem estabelecida (Fredholm et al., 1999). O tipo de interação encontrada entre

receptores adenosinérgicos e dopaminérgicos tem sido descrita como intramembrana, envolvendo interação direta entre os receptores, ou envolvendo modulação de proteína G e a conseqüente influência nas proteínas dependentes dos níveis de AMPc (Fuxe et al., 1998; Ferre et al., 2001; Hillion et al., 2002; Fredholm e Svenningsson, 2003). Evidências bioquímicas desta interação incluem a incapacidade de agonistas de receptores D₂ de neurônios gabaérgicos da região estriato-palidal exercerem atividade, quando um antagonista (CGS 21680) de receptores A₂ é também administrado (Fuxe et al., 1998). Adicionalmente, Popoli e colaboradores (1996) demonstraram que um antagonista de receptor A₁ (CPT) potencializou significativamente o efeito motor induzido pelo agonista de receptor dopaminérgico D₁, o SKF 38393, em camundongos que receberam reserpina e em ratos com lesão unilateral na região da substância negra.

O reflexo comportamental da interação dos receptores adenosinérgicos e dopaminérgicos tem como resultado alterações no controle da atividade motora (Fuxe et al., 1998; Ferré et al., 2001). A ativação motora induzida pela administração de antagonistas de receptores adenosinérgicos é revertida pela depleção da dopamina, pelo bloqueio dos receptores dopaminérgicos ou lesão destes neurônios (Ferré et al., 2001).

O papel modulador da adenosina não deve ser atribuído exclusivamente aos receptores adenosinérgicos neuronais, visto que receptores para adenosina estão presentes nos astrócitos, micróglia e oligodendrócitos (Gebicke-Haerter et al., 1996; Biber et al., 1997; Moreau e Huber, 1999; Othman et al., 2003; Wittendorp et al., 2004). Os astrócitos expressam os quatro tipos de receptores adenosinérgicos, os quais controlam a astrogliose e a liberação de diferentes substâncias que podem ter impacto na atividade neuronal (Hindley et al., 1994; Brambilla et al., 2003). Os receptores

adenosinérgicos destes tipos celulares exibem um posicionamento conveniente para a interação neurônio-glia (Cunha, 2005).

Nos próximos subitens, a modulação que o sistema adenosinérgico exerce sobre o desenvolvimento neural, a atividade motora e a nocicepção será enfatizada.

I.2.1 Modulação Adenosinérgica sobre o Desenvolvimento Neural

A presença de RNAm de receptores A_1 , bem como a presença de receptores expressos e funcionais durante os períodos de neurogênese e diferenciação neuronal, levanta a questão sobre qual o papel desempenhado pela adenosina no cérebro em desenvolvimento. Desde os primeiros dias de desenvolvimento gestacional é possível detectar RNAm de receptores A_1 no cérebro de ratos, sendo que o padrão anatômico de expressão destes receptores é muito semelhante ao padrão adulto aos 18 dias da fase gestacional (Weaver, 1996; Adén et al., 2000). Altos níveis de expressão de receptores A_1 foram encontrados no neuroepitélio, no hipocampo e no núcleo do tronco cerebral do cérebro de ratos neonatos (Weaver, 1996). Esta distribuição tecidual, particularmente no neuroepitélio, reforça a idéia do envolvimento da ativação destes receptores na neurogênese (Weaver, 1996).

A funcionalidade dos receptores adenosinérgicos na fase de desenvolvimento neural é controversa. A ausência de efeito neuroprotetor de um agonista de receptor A_1 (ADAC) na hipóxia, em preparações de cérebro de ratos aos sete dias pós-natal, sugere que estes receptores não são funcionais nesta fase do desenvolvimento, devido ao pobre acoplamento à proteína G (Adén et al., 2001). Esta explicação baseia-se na ausência de acoplamento de um antagonista tritiado do receptor A_1 de adenosina, ($[^3\text{H}]$ DPCPX) na presença de GTP. Entretanto, outras investigações demonstraram que a administração

crônica ou aguda *in vivo* de agonistas e antagonistas dos receptores adenosinérgicos tem sido uma importante ferramenta para elucidar a função destes receptores no desenvolvimento neural (Guillet e Kellogg, 1991; Adén et al., 2000; León et al., 2002; Lipska et al., 2002, Turner et al., 2002).

Estudos avaliando o efeito de agonistas de receptores A₁ durante a fase de desenvolvimento neural demonstraram um efeito deletério da ativação destes receptores, o que se opõe ao efeito neuroprotetor clássico da adenosina (Rivkees et al., 2001; Turner et al., 2002). Rivkees e colaboradores (2001) revisaram os efeitos da adenosina sobre o desenvolvimento fetal e em animais recém-nascidos, principalmente sobre o sistema cardíaco e no sistema neural. Estes autores sugeriram que os efeitos da adenosina sobre o sistema nervoso em desenvolvimento parecem ser mais proeminentes na fase pós-natal inicial, onde há um intenso período de crescimento axonal do que na fase gestacional (Rivkees et al., 2001). Efeitos como ventriculomegalia, perda de massa branca cerebral e perda de neurônios hipocâmpais e corticais foram observados após ativação dos receptores A₁ pela administração do agonista específico CPA (0,1 mg/kg/dose) (Turner et al., 2002).

A cafeína é freqüentemente utilizada para avaliar o efeito da exposição do sistema nervoso imaturo a um antagonista dos receptores adenosinérgicos, sendo uma tentativa de aproximação com os efeitos da exposição de recém-nascidos humanos às xantinas, como a cafeína e a teofilina, no tratamento da apnéia. No início da década de 90, Guillet (1990) e Guillet e Kellogg (1991) realizaram duas avaliações em ratos jovens expostos à cafeína no período neonatal. Na primeira avaliação, observou-se os efeitos da administração de cafeína na dose de 15-20 mg/kg em ratos de 2-6 dias de idade sobre a resposta locomotora à cafeína (100µmol/kg) e ao D-PIA (agonista de receptor adenosinérgico, 10 µmol/kg) nestes animais aos 12, 15, 18 e 28 dias de idade. Guillet

(1990) verificou que existe uma modificação idade-dependente na sensibilidade à cafeína e ao D-PIA. Além disso, os animais que receberam cafeína nos primeiros dias de vida exibiram insensibilidade ao efeito hiperlocomotor da cafeína, enquanto o grupo controle exibiu hiperlocomoção após a administração desta. Na segunda avaliação, Guillet e Kellogg (1991) enfatizaram o efeito deste mesmo tratamento sobre a ontogenia dos receptores A₁, verificando um aumento significativo destes receptores no córtex, no cerebelo e no hipocampo de ratos entre 14 e 90 dias de vida.

Com o principal objetivo de avaliar os possíveis efeitos da ingestão materna de cafeína sobre a expressão de receptores adenosinérgicos na prole, estudos mais recentes verificaram este efeito desde o período gestacional até fases mais avançadas do desenvolvimento. A ingestão de cafeína na dose 0,3 g/l por ratos fêmeas durante a fase gestacional promoveu pequenas modificações na expressão de receptores A₁ no córtex cerebral dos filhotes às 24 horas e aos 7 dias após o nascimento (31% e 15% de aumento na expressão, respectivamente) (Adén et al., 2000). Entretanto, León e colaboradores (2002), ao tratarem cronicamente ratas prenhas com 1,0 g/l de cafeína ou de teofilina, verificaram um significativo decréscimo no número de receptores no cérebro fetal e no cérebro materno.

O conhecimento dos mecanismos pelos quais a ativação dos receptores adenosinérgicos pelo ligante endógeno, bem como a exposição a antagonistas destes receptores, influenciam o desenvolvimento neural ainda não é esclarecido. Entretanto, assim como Guillet (1990) observaram os reflexos da exposição a antagonistas dos receptores adenosinérgicos sobre a atividade locomotora, outras investigações se preocuparam com os efeitos tardios desta exposição sobre parâmetros comportamentais. Zimmerberg e colaboradores (1991), ao administrar 1,0 ou 9,0 mg/kg de cafeína durante a primeira semana de vida de ratos, verificaram que o crescimento dos animais mostrou-

se retardado, exibiram hipoatividade na segunda semana de vida e não realizavam satisfatoriamente tarefas de aprendizado espacial.

O controle dos níveis de adenosina extracelular e, portanto, o controle da ativação dos receptores adenosinérgicos parece não ser somente importante como mecanismo neuroprotetor, mas também de crucial importância para o desenvolvimento normal das conexões neurais em cérebros imaturos.

I.2.2 Modulação Adenosinérgica sobre o Controle Motor

A avaliação da atividade locomotora de animais cronicamente tratados com cafeína resulta em uma curva dose-resposta em forma de “U” invertido (Fredholm et al., 1999). Devido ao bloqueio não seletivo dos receptores adenosinérgicos pela cafeína, há a necessidade de determinar o envolvimento exato dos diferentes subtipos de receptores adenosinérgicos na hiperlocomoção promovida por esta droga. Neste sentido, Karcz-Kubicha e colaboradores (2003) elaboraram um elegante estudo avaliando a participação dos receptores A_1 e A_{2A} no efeito locomotor da cafeína, através da administração combinada de baixas doses de um antagonista de receptores A_{2A} (MSX-3, 1,0 mg/kg) com uma dose relativamente alta de um antagonista específico dos receptores A_1 (CPT, 4,8 mg/kg). O aparente poder locomotor aditivo visto na combinação destas drogas poderia ser o mecanismo da ativação locomotora induzida pela cafeína, onde ocorreria um fraco bloqueio dos receptores A_{2A} combinado com um forte bloqueio dos receptores A_1 (Karcz-Kubicha et al., 2003). Além disto, foi sugerido que o bloqueio dos receptores A_1 adenosinérgicos é o principal mecanismo relacionado ao desenvolvimento de tolerância ao efeito locomotor da cafeína após sua administração crônica (Karcz-Kubicha et al., 2003).

A ativação dos receptores A_1 demonstrou um efeito inibitório sobre a atividade locomotora (Ferré et al., 1994). Entretanto, Halldner e colaboradores (2004) avaliaram a locomoção de camundongos que não expressam receptores A_1 e verificaram que não houve modificações drásticas na locomoção basal e na locomoção induzida por cafeína. Além disso, Halldner e colaboradores (2004) demonstraram que a cafeína exibe um efeito bifásico sobre a locomoção de camundongos sem expressão de receptores A_1 , da mesma forma que em camundongos de fenótipo selvagem. A partir da administração de baixas doses de cafeína (7,5 mg/kg), tem sido sugerido um papel modulador para os receptores A_1 sobre o efeito estimulante desta droga, visto que nos camundongos sem a expressão destes receptores houve uma maior ativação motora que aquela vista em camundongos sem expressão de receptores A_{2A} ou em camundongos de fenótipo selvagem (Halldner et al., 2004).

Apesar dos achados científicos sobre a modulação motora através dos receptores A_1 , a maioria dos efeitos modulatórios exercidos pela adenosina no controle motor é mediada pelos receptores adenosinérgicos do tipo A_{2A} . A ativação de receptores A_{2A} promove catalepsia e antagonismo dos efeitos induzidos pela apomorfina (Kafka e Corbett, 1996; Rimondini et al., 1998). Além disso, a inibição seletiva deste receptor pelo antagonista A_{2A} , SCH 58261, promove efeitos estimulatórios na atividade locomotora semelhantes à cafeína (Ralevic e Burnstock, 1998; Halldner et al., 2004). A interação entre receptores A_{2A}/D_2 parece subsidiar a explicação para os efeitos motores da cafeína (Fredholm et al., 1999; Fredholm e Svenningsson, 2003). Desta forma, uma inibição dos receptores A_{2A} pela cafeína promove um aumento da afinidade do receptor D_2 dopaminérgico pela dopamina (Ferre et al., 1992), e a ativação de receptores dopaminérgicos bloqueia os efeitos motores da cafeína (Cook e Beardsley, 2003). O tratamento crônico com um antagonista de receptores A_{2A} , SCH 58261, não desenvolve

tolerância ao seu efeito locomotor, diferentemente da clássica tolerância desenvolvida pelo tratamento crônico com cafeína (Halldner et al., 2000). A falta de tolerância por este antagonista é fundamentada na ausência de alterações na expressão de receptores D₁ dopaminérgicos, receptores A₁ adenosinérgicos e, principalmente, receptores A_{2A} após tratamento crônico (SCH 58261, 0.1 e 7.5 mg/kg durante 14 dias) (Halldner et al., 2000). Neste mesmo contexto, Cook e Beardsley (2003) avaliaram o efeito da administração de antagonistas e agonistas de receptores D_{2/3} dopaminérgicos sobre o efeito hiperlocomotor da cafeína. Estes autores sugeriram que a ativação da locomoção promovida pela cafeína é realizada por uma via independente da inibição da transmissão GABAérgica, ao contrário do que acontece na hiperlocomoção induzida pela morfina.

De Oliveira e colaboradores (2005) sugeriram que a hiperlocomoção e efeitos cognitivos, mas não a ataxia, induzidos por um antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA, MK-801, podem estar fortemente relacionados com uma hipofunção do sistema adenosinérgico, visto que a administração de cafeína 1g/l na água de beber de ratos adultos produziu tolerância a estes efeitos aos três dias de tratamento.

Outros neurotransmissores envolvidos no controle motor, como a dopamina e a acetilcolina, sofrem modulação adenosinérgica e são claramente alvos possíveis da ação estimulatória motora da cafeína. Acuas e colaboradores (2002) avaliaram o efeito da administração intraperitoneal e intravenosa de cafeína e de antagonistas seletivos de receptores adenosinérgicos sobre a liberação de acetilcolina no córtex pré-frontal e de dopamina no córtex pré-frontal e *nucleus accumbens*. Nesta investigação, os autores obtiveram resultados interessantes que podem ser resumidos em quatro itens: (1) a administração intravenosa de cafeína em doses entre 0,25 e 5,0 mg/kg promove

aumento da liberação de dopamina e acetilcolina no córtex pré-frontal; (2) a administração intraperitoneal de cafeína não altera a liberação de dopamina no *nucleus accumbens*; (3) a administração intravenosa dos antagonistas seletivos para receptores A₁ e A_{2A} adenosinérgicos, DPCPX e SCH58261, respectivamente, são capazes de aumentar a liberação de dopamina e acetilcolina no córtex pré-frontal; (4) a administração crônica de cafeína (1.0mg/kg) é capaz de prevenir o aumento da liberação de dopamina, mas não de acetilcolina em córtex pré-frontal após a administração aguda (intravenosa) de cafeína. Assim, Aquas e colaboradores (2002) propuseram que as propriedades psicoestimulantes da cafeína podem não estar relacionadas à liberação de dopamina no córtex pré-frontal. Aquas e colaboradores (2002) sugeriram que, em animais cronicamente tratados com cafeína, a tolerância ao efeito hiperlocomotor pode estar relacionada com o retorno aos níveis basais de dopamina e que a persistente liberação de acetilcolina pode promover a vigília observada nestes animais.

A avaliação do controle adenosinérgico sobre a atividade motora, além da sua importância intrínseca, é uma ferramenta muito útil como parâmetro de avaliação comportamental em modelos animais de diversas patologias, tais como esquizofrenia e Doença de Parkinson.

I.2.3 Modulação Adenosinérgica sobre a Nocicepção

O passo inicial para transmissão nociceptiva é a ativação de receptores nociceptivos nos nervos aferentes de pequeno diâmetro, os quais transmitem o sinal à camada superficial da porção dorsal da medula espinhal (Sawynok e Liu, 2003). Esta informação é retransmitida ao mesencéfalo, tálamo, sistema límbico e córtex, resultando em percepção, integração e resposta ao estímulo doloroso (Sawynok e Liu, 2003).

O ATP e a adenosina possuem a capacidade de alterar a transmissão da dor, através da ativação de seus receptores específicos, em sítios periféricos, espinhais e supra-espinhais (Burnstock e Wood, 1996; Sawynok, 1998; Gerevich e Illes, 2004). A liberação de adenosina nos sítios espinhais tem sido demonstrada na presença de altas concentrações de K^+ , de capsaicina, de substância P, de glutamato, de morfina, de serotonina e de inibidores da adenosina quinase (Sweeney et al., 1990; Cahill et al., 1993; Cahill et al., 1995; Cahill et al., 1997; Poon e Sawynok, 1998; Sandner-Kiesling, 2001). Em sítios periféricos, a adenosina pode ser liberada nos terminais de neurônios sensoriais na presença de capsaicina, de glutamato, de formalina, de inibidores da adenosina quinase e de inflamação local (Liu et al., 2001; Liu et al., 2002; Sawynok e Liu, 2003, Aumeerally et al., 2004). O ATP, o qual é uma importante fonte de adenosina extracelular, pode ser liberado por neurônios e células gliais dos sítios espinhais e periféricos, a partir da despolarização causada por altas concentrações de K^+ , bem como por inflamação local (White et al., 1985; Sawynok et al., 1993; Salter e Hicks, 1994).

Os mecanismos moleculares da ação do ATP sobre o desenvolvimento da dor são provenientes de dados que envolvem a descrição de receptores P2 em neurônios sensoriais (Burnstock, 2000; Inoue et al., 2005). Os subtipos P2X₃, P2X_{2/3}, P2X₄, P2Y₁ e P2Y₂ de receptores purinérgicos parecem ser os receptores pelos quais o ATP exerce seus efeitos nociceptivos em neurônios sensoriais (Gerevich e Illes, 2004; Inoue et al., 2005). Análises eletrofisiológicas em cultura de neurônios sensoriais do gânglio do ramo dorsal demonstraram que entre 40 e 96% destes neurônios respondem à administração de ATP, aumentando as concentrações intracelulares de cálcio ou despolarizando (Burnstock e Wood, 1996).

A ação da adenosina na transmissão da dor exhibe efeitos diversos e dependentes do local e tipo de receptor ativado (Sawynok, 1998). A adenosina pode interferir na transmissão da dor em neurônios espinhais, primariamente através de receptores A_1 , e em neurônios periféricos via receptores A_1 e A_{2A} (Taiwo e Levine, 1990; Aley et al., 1995; Khasar et al., 1995; Lee e Yaksh, 1996; Poon e Sawynok, 1998).

Apesar do mecanismo pelo qual a adenosina exerce seus efeitos antinociceptivos espinhais ser ainda pouco conhecido, sabe-se claramente que o receptor A_1 está envolvido (Sawynok e Liu, 2003). A ativação de receptores A_1 localizados em neurônios da medula espinhal ou em interneurônios pode resultar em inibição pós-sináptica da transmissão excitatória, devido à ativação de canais de K^+ e conseqüente hiperpolarização (Sawynok e Liu, 2003).

O tratamento crônico de ratos com morfina promoveu diminuição da expressão de receptores A_1 adenosinérgicos espinhais (Tao e Liu, 1992). A administração direta de agonistas e antagonistas de receptores adenosinérgicos em sítios espinhais demonstrou que as ações diretas ou indiretas de agentes adenosinérgicos produz nocicepção em diversos testes para avaliação de dor, incluindo testes de dor aguda, dor inflamatória e dor neuropática (Sawynok, 1998). A administração de adenosina produz, em sítios espinhais, ação analgésica fraca, provavelmente devido a rápida captação e/ou degradação da adenosina (Keil e DeLander, 1992).

Os receptores A_{2A} estão presentes em neurônios do gânglio dorsal e potencialmente presentes nos terminais pré-sinápticos espinhais dos neurônios sensoriais aferentes (Sawynok e Liu, 2003). O envolvimento dos receptores A_2 na transmissão espinhal da dor é menos conhecida, mas é sugerido que as ações supra-espinhais da morfina sejam mediadas por estes receptores, enquanto que a

administração de β -endorfinas parece ter suas ações mediadas por receptores A_1 e A_2 (Sawynok, 1998). O aumento da expressão de receptores A_{2A} em neurônios motores da medula espinhal foi observado após isquemia e após lesão, sugerindo um papel neuroprotetor para estes receptores (Cassada et al., 2002; Sawynok e Liu, 2003).

A administração exógena local de agonistas de receptores A_1 nas patas traseiras de ratos produz antinocicepção, enquanto que a administração de agonistas de receptores A_2 produz pró-nocicepção (Sawynok, 1998). As ações mediadas pelos receptores A_1 em neurônios sensoriais resultam em inibição da enzima adenilato ciclase e, portanto, uma diminuição dos níveis de AMPc (Sawynok, 1998). As ações mediadas pelos receptores A_2 , principalmente A_{2A} , ocorrem através da ativação desta mesma enzima e promovem um aumento dos níveis de AMPc (Sawynok, 1998).

Aley e Levine (1997a) apresentaram uma hipótese de interação dos receptores A_1 adenosinérgicos, opióides μ e adrenérgicos α_2 para o desenvolvimento de antinocicepção em sistema nervoso periférico. Esta hipótese baseia-se primeiramente no fato destes receptores agirem por intermédio de uma via comum, a inibição da síntese de AMPc através da ativação de proteína G inibitória (Aley e Levine, 1997a; 1997b). Desta forma, o receptor opióide μ estaria arranjado topologicamente entre os receptores α_2 adrenérgicos e A_1 adenosinérgicos, ocorrendo uma interação direta entre estes receptores (Aley e Levine, 1997a; 1997b). Esta interação parece existir entre receptores adrenérgicos α_2 e adenosinérgicos A_1 , bem como entre receptores adrenérgicos α_2 e opióides μ , mas não entre receptores μ -opióides e A_1 adenosinérgicos, sugerindo adicionalmente uma tolerância e dependência cruzada entre estes receptores.

Os receptores adenosinérgicos de baixa afinidade, A_{2B} e A_3 , também são referenciados como capazes de alterar a transmissão da dor. Abo-Salem et al. (2004) descreveram propriedades analgésicas para o PSB-55, um antagonista de receptores A_{2B} .

Adicionalmente, agonistas de receptores A₃ produziram uma resposta nociceptiva semelhante à administração de formalina, bem como uma amplificação da resposta a baixas concentrações de formalina (Sawynok, 1998).

O estímulo doloroso pode ser alterado pela indução de estresse e o termo analgesia induzida por estresse (SIA, do inglês *Stress-Induced Analgesia*) é bem estabelecido (Blustein et al., 1995). Dependendo da característica do estressor, a analgesia é induzida por receptores opióides ou não opióides. A liberação de adenosina é sugerida como um componente importante para o desenvolvimento de analgesia em sítios espinhais após a administração de morfina (DeLander e Hopkins, 1986; Cahill et al., 1995).

O desenvolvimento de drogas capazes de interferir na modulação adenosinérgica da transmissão da dor pode ser exemplificado pela co-administração de cafeína com anti-inflamatórios como a aspirina e acetaminofen, bem como pela utilização de anti-depressivos tricíclicos que bloqueiam a captação de adenosina (Phillis e Wu, 1982; Sawynok e Yaksh, 1993; Esser e Sawynok, 2000). A ação antinociceptiva da cafeína parece estar relacionada com sua ação em sítios supraespinhais, embora a administração de agonistas de receptores adenosinérgicos nestes sítios também produza antinocicepção (Herrick-Davis et al., 1989).

A modulação adenosinérgica da transmissão da dor é complexa e têm sido alvo de investigação, sendo a manipulação do sistema adenosinérgico um interessante alvo de investigação, principalmente com a finalidade de promover terapias alternativas para o tratamento da dor, como por exemplo, a dor neuropática e a dor inflamatória.

I.3 Objetivos

I.3.1 Objetivo Geral

A adenosina exerce um importante papel neuromodulador sobre diversos sistemas de neurotransmissão. A presença da adenosina e seus receptores específicos desde fases iniciais do desenvolvimento cerebral sugere que o cérebro imaturo é suscetível à ação neuromoduladora da adenosina. Considerando estes aspectos, o objetivo geral deste estudo é avaliar os efeitos de intervenções no sistema adenosinérgico durante as fases gestacional e neonatal sobre atividades enzimáticas, atividade locomotora e limiar de dor.

I.3.2 Objetivos específicos

1) Considerando que a cafeína é um antagonista adenosinérgico presente em diversos alimentos e bebidas amplamente consumidos e que a principal fonte de adenosina endógena é a degradação dos nucleotídeos da purina, é objetivo deste estudo:

- Avaliar o efeito do tratamento com cafeína na forma crônica e aguda sobre as atividades de hidrólise de ATP, ADP e AMP em sinaptossomas de hipocampo e estriado de ratos machos adultos.

2) Tem sido demonstrada que a cafeína é uma droga com um efeito bifásico sobre a atividade locomotora, visto que altera o padrão modulador sobre a locomoção exercido

pela adenosina. Além disto, a cafeína é altamente consumida mesmo em situações especiais como gestação e lactação. Devido às suas propriedades hidrofóbicas, a cafeína atravessa as barreiras biológicas como a placenta e a barreira hemato-encefálica, podendo afetar o cérebro em desenvolvimento. Portanto, é objetivo deste estudo:

- Avaliar o efeito da ingestão de cafeína durante a fase gestacional e lactacional sobre a hiperlocomoção induzida pelo antagonista glutamatérgico MK-801 em ratos machos jovens.

3) Considerando as possíveis influências da cafeína sobre o cérebro imaturo durante a gestação e lactação, bem como a modulação adenosinérgica sobre a transmissão da dor, é objetivo deste estudo:

- Avaliar a influência do consumo de cafeína durante a fase gestacional e lactacional sobre o limiar de dor em ratos machos jovens e adultos.

- Avaliar a influência do consumo de cafeína durante a fase gestacional e lactacional sobre o desenvolvimento de analgesia pós-estresse em ratos machos adultos.

4) Considerando os efeitos da administração de cafeína na fase gestacional e neonatal, as funções moduladoras da adenosina sobre a neurotransmissão, tais como a colinérgica, e a cascata de hidrólise das ecto-nucleotidases como a principal fonte extracelular de adenosina, é objetivo deste estudo:

- Avaliar a influência do consumo de cafeína durante a fase gestacional e lactacional sobre as atividades das ecto-nucleotidases e da acetilcolinesterase em hipocampo de ratos jovens da prole.

II RESULTADOS

II.1. CAPÍTULO 1 - Da Silva, R.S; Bruno, A. N; Battastini, A. M. O; Sarkis, J. J. F.; Lara, D. R.; Bonan, C. D. Acute Caffeine Treatment Increases Extracellular Nucleotide Hydrolysis from Rat Striatal and Hippocampal Synaptosomes.

Publicado no periódico Neurochemical Research. 2003; 28 (8): 1273–1278.

Acute Caffeine Treatment Increases Extracellular Nucleotide Hydrolysis from Rat Striatum and Hippocampal Synaptosomes

Rosane Souza da Silva,¹ Alessandra Nejar Bruno,¹ Ana Maria Oliveira Battastini,¹ João José Freitas Sarkis,¹ Diogo Rizzato Lara,² and Carla Denise Bonan^{2,3}

(Accepted February 28, 2003)

The psychostimulant caffeine promotes behavioral effects such as hyperlocomotion, anxiety, and disruption of sleep by blockade of adenosine receptors. The availability of extracellular adenosine depends on its release by transporters or by the extracellular ATP catabolism performed by the ecto-nucleotidase pathway. This study verified the effect of caffeine on NTP-Dase 1 (ATP diphosphohydrolase) and 5'-nucleotidase of synaptosomes from hippocampus and striatum of rats. Caffeine and theophylline tested *in vitro* were unable to modify nucleotide hydrolysis. Caffeine chronically administered in the drinking water at 0.3 g/L or 1 g/L for 14 days failed to affect nucleotide hydrolysis. However, acute administration of caffeine (30 mg/kg, ip) produced an enhancement of ATP (50%) and ADP (32%) hydrolysis in synaptosomes of hippocampus and striatum, respectively. This activation of ATP and ADP hydrolysis after acute treatment suggests a compensatory effect to increase adenosine levels and counteract the antagonist action of caffeine.

KEY WORDS: Adenosine; caffeine; ecto-nucleotidases; NTPDases; 5'-nucleotidase; theophylline.

INTRODUCTION

Caffeine is a psychoactive substance present in several beverages and food. It has been considered that the caffeine is a potential model drug of abuse (1,2).

The biochemical mechanism that underlies the actions of caffeine in relevant concentrations for human consumption is blockade of adenosine A₁ and A_{2A} receptors (1). Adenosine A₁ receptors modulate synaptic activity by inhibiting the release of several neurotransmitters and are highly distributed in the central nervous system (CNS), with particularly high concentrations in the hippocampus, cortex, cerebellum, and thalamus (3,4). Adenosine A_{2A} receptors are particularly expressed to the striatum, where they interact with dopamine D₂ receptors (3,4). Blockade of A₁ and A_{2A} receptors is of particular interest because one of the actions of adenosine in the CNS is related with the regulation of release of several neurotransmitters. The interaction of the A₁ and A_{2A} receptors with the dopaminergic receptors D₁ and D₂, respectively, is a potential therapeutic target in disorders such as Parkinson's disease and schizophrenia (5,6)

¹ Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2600–Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Laboratório de Pesquisa Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Address reprint requests to: Carla Denise Bonan, Laboratório de Pesquisa Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55 51 3320 3545 (ext. 4158); Fax: +55 51 3320 3612; E-mail: bonan@portoweb.com.br

The effects of caffeine and theophylline on adenosine receptors have been widely studied in different species and tissues, where changes in expression and binding of adenosine A₁ and A₂ receptors have been associated with administration of these substances (7,8). The intake of caffeine and its metabolite, theophylline, has been suggested to modulate adenosine A₁ receptors, promoting an upregulation in rat brain that is not always dependent on mRNA changes (9). However, in neonatal life and pregnancy, a downregulation of these receptors has been shown (8). Svenningsson et al. (10) showed a downregulation in adenosine A_{2A} receptors levels and their mRNA in rostral parts of striatum, but an increased expression of adenosine A₁ receptors mRNA in the lateral amygdala after chronic and acute treatment with caffeine, respectively.

The physiological activation of adenosine receptors is performed by extracellular adenosine derived from the bidirectional transporter system or by the extracellular catabolism of adenine nucleotides (3). The different sources of adenosine have been related to selective activation of the adenosine receptors, because it has been hypothesized that the adenosine released as such mainly activates inhibitory A₁ receptors, whereas A_{2A} receptors would be mainly activated by adenosine provided from the catabolism of nucleotides (11). In recent years, studies have demonstrated that members of several families of ecto-nucleotidases can contribute to the extracellular hydrolysis of nucleotides (for review, see 12). Nucleoside 5'-tri- and diphosphates can be hydrolyzed by members of the E-NTPDase family (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase family), whereas nucleosides 5'-monophosphates are mainly subjected to hydrolysis by ecto-5'-nucleotidase (12,13), producing the respective nucleoside. These enzymes promote the complete ATP hydrolysis to adenosine and may play an important role in physiological and pathological conditions (14), controlling the activation and the availability of ligands to nucleotide and nucleoside receptors (12).

There are few studies on the xanthine effects on the ATPase and ecto-nucleotidases. Theophylline caused increase of Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase activity from crude synaptosomal membranes in hippocampal region (15). Theophylline and caffeine, in concentrations of 1 mM, inhibited Na⁺,K⁺-ATPase (EC 3.6.1.38) activity in rat pancreatic islets (16). Studies showed a significant inhibition of rabbit renal 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), cyclic nucleotide phosphodiesterase (EC 3.1.4.17), and adenosine deaminase (EC 3.5.4.4) by theophylline, but only at millimolar concentration (17). Furthermore, a significant inhibition of a 5'-nucleotidase from rat

brain by different xanthine derivatives has been observed (18–20).

Considering that this pathway has been postulated to be the main source of adenosine at the synaptic level (21), we investigated ATP, ADP, and AMP hydrolysis in hippocampal and striatal synaptosomes obtained from rats submitted to chronic and acute treatment with caffeine. In addition, we verified the influence of caffeine and theophylline on this pathway *in vitro* using synaptosomes from hippocampus and striatum of rats.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Animals and Treatments. A total of 70 male Wistar rats (205 ± 37 g, age 60–80 days) from our breeding stock were used in the study. Animals were housed in cages with food *ad libitum* under a 12-h light/12-h dark cycle (light on at 07:00 AM) at a temperature of 25 ± 1°C. In the acute caffeine treatment, animals received a single intraperitoneal injection of 30 mg/kg of caffeine (1 mL/kg, dissolved in 0.9% NaCl solution) at 60 min before the sacrifice. Controls received a single injection of saline. In the chronic caffeine treatment, the drinking solutions with 0.3 g/L or 1 g/L of caffeine were exchanged every third day to fresh solution. Control animals received ordinary tap water. The daily intake was measured in all groups.

Procedures for the care and use of animals were adopted according to the regulations published by the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC).

Synaptosomes Preparation. Animals were sacrificed by decapitation, and the brain structures were removed to an ice-cold medium solution (320 mM sucrose, 5 mM HEPES, pH 7.5, and 0.1 mM EDTA). Structures were gently homogenized in 5 volumes of ice-cold medium solution with a motor-driven Teflon glass homogenizer. The synaptosomes were isolated as described previously by Nagy and Delgado-Escueta (22). Briefly, 0.5 ml of the crude mitochondrial fraction was mixed with 4 ml of an 8.5% Percoll solution and layered onto an isoosmotic Percoll/sucrose discontinuous gradient (10/16%). The synaptosomes that banded at the 10/16% Percoll interface were collected with wide-tip disposable plastic transfer pipettes. The synaptosomal fractions were then washed twice at 15,000 × g for 20 min with the same ice-cold medium to remove the contaminating Percoll. The synaptosome pellet was resuspended to a final protein concentration of approximately 0.5 mg/ml. To ascertain that the extracellular nucleotides hydrolysis was provided by intact synaptosomes, a continuous monitoring was made by determination of LDH activity. The material was prepared fresh daily and maintained at 0°–4°C throughout preparation.

Enzyme Assays. The reaction medium used to assay ATP and ADP hydrolysis was essentially as described previously (23) and contained 5.0 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose, and 45 mM TRIS-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µl. The reaction medium used to assay 5'-nucleotidase activity contained 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 0.15 M sucrose in a final volume of 200 µl (24). For *in vitro* assays, caffeine or theophylline, at the concentrations of 10, 100, 500, and 1000 µM, were added to the reaction mixture. The synaptosomal fractions (10–20 µg protein) were added to the reaction mixture, preincubated for 10 min, and incubated for 20 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP, ADP, or AMP to a final concentration of 1 mM and stopped by the addition of 200 µl

10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10 min, and samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) (25). Incubation times and protein concentration were chosen to ensure the linearity of the reaction. Controls with the addition of the enzyme preparation after addition of trichloroacetic acid were used to correct nonenzymatic hydrolysis of the substrates. All samples were run in triplicate. Protein was measured by the Coomassie blue method (26), using bovine serum albumin as standard.

Statistical Analysis. The data are expressed as mean \pm SD and were analyzed by Student's *t* test or by one-way ANOVA, followed by the Duncan test as post hoc test, considering a level of significance of 5%.

RESULTS

Effect of Acute Caffeine Treatment on Ecto-Nucleotidase Activities. As shown in Fig. 1A, acute treatment with 30 mg/kg caffeine induced a significant

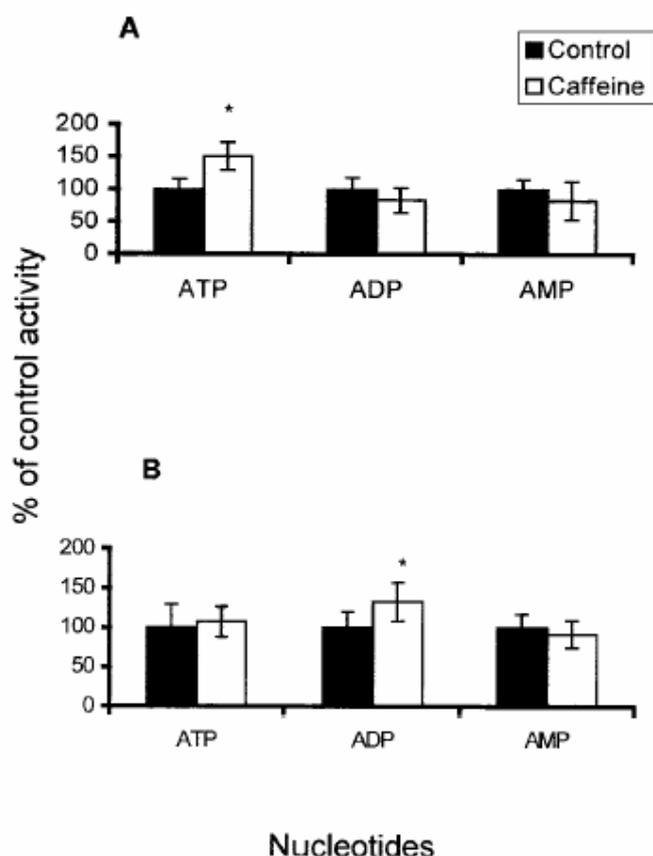


Fig. 1. Effect of acute caffeine treatment (30 mg/kg, ip) on ATP, ADP, and AMP hydrolysis from hippocampal (A) and striatal (B) synaptosomes. Bars represent mean \pm SD. *n* per group was 5–7 animals. In synaptosomes from hippocampus, control activities were 114.29 ± 18.26 , 55.93 ± 10.14 , and 34.30 ± 5.03 nmol min^{-1} mg^{-1} of protein for ATP, ADP, and AMP hydrolysis, respectively. In synaptosomes from striatum, control activities were 144.43 ± 41.64 , 49.40 ± 9.83 , and 25.12 ± 4.34 nM Pi min^{-1} mg^{-1} of protein for ATP, ADP, and AMP hydrolysis, respectively. *Significantly different from the respective control group (Student's *t* test, $P < .05$).

increase of ATP hydrolysis in synaptosomes from hippocampus of rats (50% $P < .05$), but no significant changes in ADP and AMP hydrolysis in the same condition. In synaptosomes from striatum, acute caffeine treatment produced a significant increase in ADP hydrolysis (32%; $P < .05$), but ATP and AMP hydrolysis were not altered by acute treatment with caffeine (Fig. 1B).

Effect of Chronic Caffeine Treatment on Ecto-nucleotidase Activities. The animals were submitted to chronic treatment with caffeine at 0.3 g/L and 1 g/L in their drinking water for 14 days. Caffeine consumption was estimated from the loss of water from the drinking bottles. Daily water intake in all groups of rats (control and caffeine-treated with 0.3 g/L or 1 g/L) was not significantly different (Table I). There were no differences in the ATP, ADP, and AMP hydrolysis in synaptosomes from the hippocampus (Fig. 2A) and striatum (Fig. 2B) of rats treated for 14 days in both caffeine concentrations used.

Effect of Caffeine and Theophylline on Nucleotide Hydrolysis in Vitro. Caffeine and theophylline, at the concentrations tested (10, 100, 500, and 1000 μM), were unable to modify ATP, ADP, and AMP hydrolysis when compared to the control (no caffeine or theophylline added) in synaptosomes from hippocampus and striatum of rats (data not shown).

DISCUSSION

The aim of this study was to verify the effect of acute and chronic treatment with caffeine on the ecto-nucleotidase pathway in synaptosomes from hippocampus and striatum of rats. Furthermore, *in vitro* studies have been conducted to provide more elements about the direct interaction of caffeine and theophylline and the enzymes involved in nucleotide hydrolysis. The ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) and NTPDase (EC 3.6.1.5) activities from hippocampus and striatum of adult rats did not demonstrate significant changes in the presence of theophylline and caffeine in the concentrations tested.

Table I. Caffeine Consumption in Chronic Treatment

Groups (14 days)	Fluid consumption (ml/day/kg)	Dose of caffeine (mg/day/kg)
Control	149.5 ± 38.2	0
0.3 mg/ml	159.9 ± 25.2	48 ± 7.6
1 mg/ml	164.4 ± 26.8	164.4 ± 26.8

Note: Values are expressed as means \pm SD.

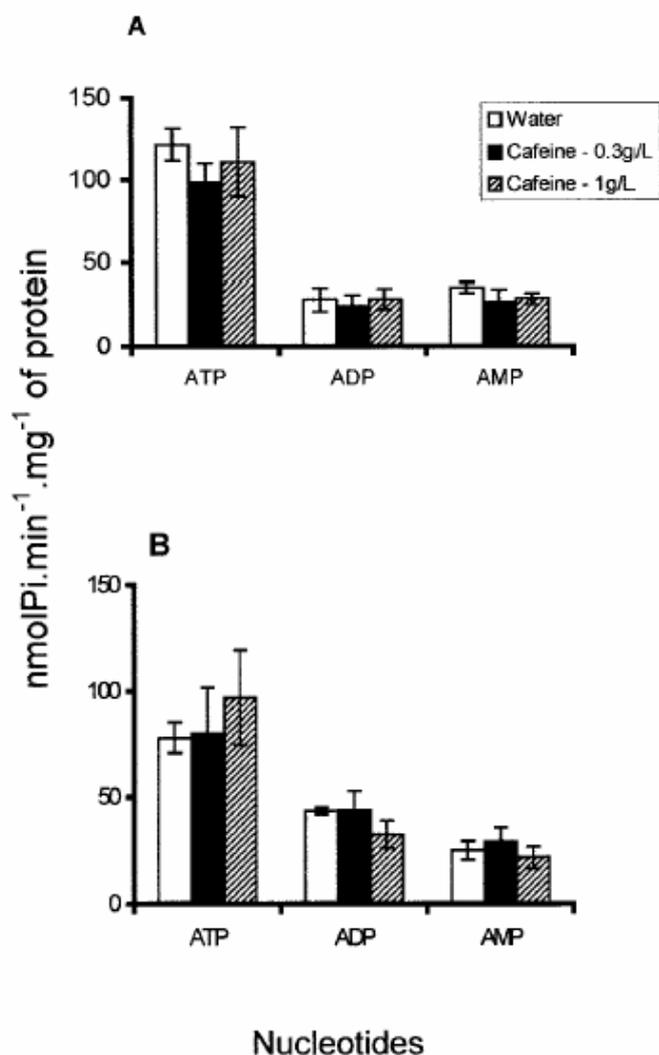


Fig. 2. Effect of chronic caffeine treatment (0.3 or 1 g/L in the drinking water, during 14 days) on the ATP, ADP, and AMP hydrolysis in hippocampal (A) and striatal (B) synaptosomes of rats. Bars represent mean \pm SD. n per group was 5–7 animals.

Studies about the differences in acute and chronic exposure to adenosine ligands showed that the effects of acute administration of a particular ligand can be opposite to its chronic effects, which could be due to differences between the periods of treatment, caffeine doses, administration methods, animal gender and age (1,8,27). When we tested the effect of acute treatment of caffeine (30 mg/kg, ip) on the ecto-nucleotidase pathway, we observed an increase in ATP and ADP hydrolysis in synaptosomes from hippocampus and striatum, respectively. These results suggest that caffeine, at acute doses, may play a modulatory role on the ecto-nucleotidase pathway, indirectly modulating the availability of adenine nucleotides and, consequently, adenosine levels in the synaptic cleft. The hippocampus presents a high density of A_1 receptors,

and the antagonist actions of caffeine promote a decrease in the inhibitory tonus exerted by adenosine on these receptors (4). Thus it is possible to suggest that caffeine could impair the neuromodulatory actions of adenosine, leading to an increase of neurotransmitter release, including ATP, because it is coreleased with several neurotransmitters (28). Consequently, an increase of ATP and ADP hydrolysis by the ecto-nucleotidase pathway may be a compensatory mechanism to increase adenosine levels and counteract the antagonist action of caffeine.

Furthermore, there is a different expression of adenosine receptors in hippocampus and striatum. The different effects induced by caffeine on nucleotide hydrolysis in these structures could indicate a functional compartmentalization of ecto-nucleotidases. It has been shown that an ecto-ATPase (NTPDase 2) is co-expressed with an ecto-ATP diphosphohydrolase (NTPDase 1) in the rat brain (29). Furthermore, studies have demonstrated that the ecto-apyrase and ecto-ATPase may be differently distributed with specialized and different functions in different regions of the same tissue (30). The differences observed in ATP and ADP hydrolysis in synaptosomes from hippocampus and striatum suggest that the two related extracellular nucleotide-hydrolyzing enzymes may be involved in the effects observed. The increase in ATP hydrolysis in synaptosomes from hippocampus might involve an ecto-ATPase (NTPDase 2), whereas the increase in ADP hydrolysis in synaptosomes from striatum may be related to an ecto-apyrase.

It has been shown that systemic administration of caffeine can preferentially increase extracellular levels of dopamine and glutamate using *in vivo* microdialysis in rats (31). Studies have observed that glutamate can stimulate ADP and AMP hydrolysis in cultured neuronal cells and increase ATP hydrolysis in hippocampal slices (32,33). It is possible to suggest that the acute administration of caffeine can contribute to an increase in glutamate levels, which could exert a modulatory effect on ecto-nucleotidase activities. In this condition, the ecto-nucleotidase pathway could be responding to the glutamate increase in relation to balance of extracellular ATP, ADP, and adenosine levels in hippocampus and striatum of rats. In contrast, the absence of these effects in chronic treatment could be due to tolerance development and the reestablishment of the inhibitory tonus exerted by adenosine on the neurotransmitters release, such as glutamate.

Chronic treatment with caffeine is mainly associated with an upregulation of adenosine A_1 receptor (27). However, other studies pointed out a downregu-

lation or absence of effect on the A₁ receptor after long-term caffeine exposure (8,34). León et al. (8) showed a downregulation of A₁ receptors after chronic caffeine intake (1 g/L for 14 days) and deduced that the antagonism of A₁ receptors by caffeine can increase extracellular adenosine levels and promote downregulation by an excess of the agonist. This is supported by studies that demonstrated that A₁ receptors antagonists promote increase of extracellular adenosine levels (35). However, there are few studies exploring the effects of caffeine on ecto-nucleotidase activities (1,21). In our investigation, the administration of 0.3 g/L (equivalent dose of normal human consumption) and 1 g/L caffeine in the drinking water during 14 days did not promote any effect on nucleotide hydrolysis in synaptosomal fractions. Animals submitted to long-term caffeine treatment develop tolerance, which is possibly related to upregulation of A₁ receptors (8,36). Svenningsson et al. (10) showed that oral administration of caffeine (0.3 g/L for 14 days) leads to development of tolerance to the stimulatory effect of a challenge with caffeine. These results suggests that the modulation of nucleotide hydrolysis is not relevant for the mechanisms of tolerance development to caffeine, because there are no significant changes in nucleotide hydrolysis after long-term intake of caffeine.

In conclusion, we have shown that acute administration of caffeine promoted an enhancement of ATP and ADP hydrolysis in synaptosomes of hippocampus and striatum, respectively. In addition, chronic caffeine exposure was unable to modify NTPDase and 5'-nucleotidase activities. Thus, it seems that high acute concentrations of caffeine can modulate the ecto-nucleotidase pathway, which could produce an increase in adenosine levels to counteract the antagonist actions of caffeine.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, Brazil), Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil). R. S. S is a recipient of a predoctoral fellowship from CNPq-Brazil.

REFERENCES

1. Fredholm, B. B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A., and Zvartau, E. E. 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51:83–133.
2. Griffiths, R. R. and Chausmer, A. L. 2000. Caffeine as a model drug of dependence: Recent developments in understanding caffeine withdrawal, the caffeine dependence syndrome and caffeine negative reinforcement. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* 20:223–231.
3. Dunwiddie, T. V. and Masino, S. A. 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:31–55.
4. Fredholm, B. B., Ijzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., and Linden J. 2001. International Union of Pharmacology, XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53:527–552.
5. Sebastião, A. M. and Ribeiro, A. 2000. Fine tuning neuromodulation by adenosine. *TIPS.* 21:341–346.
6. Ferré, S., Popoli, P., Giménez-Llort, L., Rimondini, R., Müller, C. E., Strömberg, L., Ögren, S. O., and Fluxé, K. 2001. Adenosine/dopamine interaction: Implications for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord.* 7:235–241.
7. Jacobson, K. A., Nikodijević, O., Padgett, W. L., Gallo-Rodriguez, C., Maillard, M., and Daly, J. W. 1993. 8-(3-Chlorostyryl)caffeine (CSC) is a selective A₂-adenosine antagonist *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett.* 323(1–2):141–144.
8. León, D., Albasanz, J. L., Ruiz, M. A., Fernandez, M., and Martín, M. 2002. Adenosine A₁ receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J. Neurochem.* 82:625–634.
9. Johansson, B., Ahlberg, S., van der Ploeg, I., Brené, S., Lindfors, N., Persson, H., and Fredholm, B. B. 1993. Effect of long-term caffeine treatment on A₁ and A₂ adenosine receptor binding and on mRNA levels in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 347:407–414.
10. Svenningsson, P., Nomikos, G. G., and Fredholm, B. B. 1999. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *J. Neurosci.* 19:4011–4022.
11. Cunha, R., Almeida, T., and Ribeiro, J. A. 2001. Parallel modification of adenosine extracellular metabolism and modulatory action in the hippocampus of aged rats. *J. Neurochem.* 76:372–382.
12. Zimmermann, H. 2001. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52:44–56.
13. Zimmermann, H. and Braun, N. 1999. Ecto-nucleotidases: Molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog. Brain Res.* 120:371–385.
14. Bonan, C. D., Schetinger, M. R., Battastini, A. M. O., and Sarkis, J. J. 2001. Ectonucleotidases and synaptic plasticity: Implications in physiological and pathological conditions. *Drug Dev. Res.* 52:57–65.
15. Lachowicz, L., Janiszewska, G., Wojtkowiak, R., Wojtkowiak Z. 1983. Ca²⁺ Mg²⁺-ATPase activity of synaptosome fraction and synaptosomal membranes from different areas of rat brain. *Int. J. Biochem.* 15:163–165.
16. Tung, P., Pai, G., Johnson, D. G., Punzalan, R., and Levin, S. R. 1990. Relationships between adenylate cyclase and Na⁺, K⁺-ATPase in rat pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 265:3936–3939.
17. Fredholm, B. B., Hedqvist, P., and Vernet, L. 1978. Effect of theophylline and other drugs on rabbit renal cyclic nucleotide phosphodiesterase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase. *Biochem. Pharmacol.* 27:2845–2850.
18. Tsuzuki, J. and Newburgh, R. W. 1975. Inhibition of 5'-nucleotidase in rat brain by methylxanthines. *J. Neurochem.* 25:895–896.
19. Fredholm, B. B. and Lindgren, E. 1983. Inhibition of soluble 5'-nucleotidase from rat brain by different xanthine derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 32:2832–2834.
20. Jensen, M. H. and Jacobsen, J. B. 1987. The influence of theophylline and phenobarbital on rat brain 5'-nucleotidase. *Acta Neurol. Scand.* 76:46–49.

21. Cunha, R. 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: Different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38:107–125.
22. Nagy, A. K. and Delgado-Escueta, A. V. 1984. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using a non toxic isoosmotic gradient (Percoll). *J. Neurochem.* 43:1114–1123.
23. Battastini, A. M. O., Rocha, J. B. T., Barcellos, C. K., Dias, R. D., and Sarkis, J. J. F. 1991. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16:1303–1310.
24. Heymann, D., Reddington, M., and Kreutzberg, G. W. 1984. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.* 43:971–978.
25. Chan, K., Delfert, D., and Junguer, K. D. 1986. A direct colorimetric assay for Ca^{+2} -ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157:375–380.
26. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:218–254.
27. Jacobson, K. A., Von Lubitz, D. K., Daly, J. W., and Fredholm, B. B. 1996. Adenosine receptor ligands: Differences with acute versus chronic treatment. *TIPS* 17:108–113.
28. Ralevic, V. and Burnstock, G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50:413–492.
29. Kegel, B., Braun, N., Heine, P., Maliszewski, C. R., and Zimmermann, H. 1997. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacol.* 36:1189–200.
30. Lewis-Carl, S. and Kirley, T. L. 1997. Immunolocalization of the ecto-ATPase and ecto-apyrase in chicken gizzard and stomach: Purification and N-terminal sequence of the stomach ecto-apyrase. *J. Biol. Chem.* 272:23645–23652.
31. Solinas, M., Ferre, S., You, Z. B., Karcz-Kubicha, M., Popoli, P., and Goldberg, S. R. 2002. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 22:6321–6324.
32. Boeck, C. R., Bronzatto, M. J., Souza, D. G., Sarkis, J. J., and Vendite, D. 2000. The modulation of ecto-nucleotidase activities by glutamate in cultured cerebellar granule cells. *Neuroreport* 11:709–712.
33. Bruno, A. N., Bonan, C. D., Wofchuk, S. T., Sarkis, J. J., and Battastini, A. M. 2002. ATP diphosphohydrolase (NTPDase 1) in rat hippocampal slices and effect of glutamate on the enzyme activity in different phases of development. *Life Sci.* 71: 215–225.
34. Adén, U., Herlenius, E., Tang, L., and Fredholm, B. B. 2000. Maternal intake has a minor effects on adenosine receptor ontogeny in the rat brain. *Pediatr. Res.* 48: 177–183.
35. Andresen, B. T., Gillespie, D. G., Mi, Z., Dubey, R., and Jackson, E. 1999. Role of adenosine A_1 receptors in modulating extracellular adenosine levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291: 76–80.
36. Fredholm, B. B. 1982. Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine. *Acta Physiol. Scand.* 115:283–286.

II.2. CAPÍTULO 2 - Da Silva, R.S; Hoffman, A.; Souza, D. O.; Lara, D. R.; Bonan, C.

D. Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young

rats. Publicado no periódico European Journal of Pharmacology. 2005; 509: 155–159.



Short communication

Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats

Rosane Souza da Silva^{a,b,*}, Anselmo Hoffman^c, Diogo Onofre de Souza^c,
Diogo R. Lara^c, Carla Denise Bonan^a

^aLaboratório de Pesquisa Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

^bLaboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, Brazil

^cLaboratório de Neurobiologia Experimental, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 22 September 2004; received in revised form 5 January 2005; accepted 7 January 2005

Abstract

Here we have investigated the effects of maternal caffeine intake (1 g/l) on MK-801-induced hyperlocomotion in rat pups. Animals submitted to caffeine treatment during the gestational and lactational period were separated in two groups: caffeine-treated group (up to 21 days old) and washout group (caffeine treatment up to 7 days old). MK-801 (0.25 mg/kg, i.p.) promoted hyperlocomotion in control rats, but this stimulatory effect was significantly decreased in caffeine-treated and washout groups. The permanent effect after caffeine withdrawal suggests durable or adaptive changes during neurodevelopment, mainly on adenosine receptors or neurotransmitter systems modulated by adenosine, such as the glutamatergic system.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Adenosine; Caffeine; Neurodevelopment; Maternal intake; Glutamate; Locomotor activity

1. Introduction

Caffeine is a psychostimulant drug constituent of many beverages and foods. The biochemical basis for caffeine effects is blockade of adenosine receptors (Fedholm et al., 1999). Once in the extracellular space, adenosine acts via specific G-protein-coupled receptors that include A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ adenosine receptors (Sebastião and Ribeiro, 2000). The physiological activation of adenosine receptors exerts modulatory roles on several neurotransmitters such as glutamate, dopamine

and acetylcholine (Sebastião and Ribeiro, 2000). Among their effects, adenosine A₁ and A_{2A} receptors mediate inhibition or facilitation of neurotransmitter release, respectively.

Caffeine non-selectively blocks adenosine A_{2a} and A₁ receptors (Fedholm et al., 1999). One of the main effects of caffeine administration is the regulation of motor activity (Fedholm et al., 1999; Karcz-Kubicha et al., 2003). Caffeine promotes a biphasic dose–response curve and the motor-activating effects of acute caffeine administration involve central blockade of both adenosine A₁ and A_{2A} receptors. When caffeine is chronically administered, tolerance to its locomotor effect develops, probably involving mechanisms related to adenosine A₁ receptors (Karcz-Kubicha et al., 2003).

Antagonists of NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) receptors, such as MK-801, phencyclidine and ketamine promote

* Corresponding author. Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619 900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 513320 3500x4158; fax: +55 513320 3612.

E-mail address: rosanebio@yahoo.com.br (R.S. da Silva).

hyperlocomotion in rodents and their effects in humans are similar to several clinical symptoms of schizophrenia, being considered a pharmacological model for this disorder (Andine et al., 1999). Studies have shown that adenosine receptor agonists counteract the effects of NMDA receptor antagonists in discriminative behavior (Browne and Welch, 1982) and hyperlocomotor activity (Rimondini et al., 1997). However, chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor effect induced by MK-801 (Dall'Igna et al., 2003).

In the immature rat brain, adenosine A₁ receptors can be detected from the second week of embryonic period (Weaver, 1996; Adén et al., 2001). The distribution of adenosine A₁ receptors at 20 days of gestational period is very similar to that observed in adult rat brain (Weaver, 1996). However, the functionality of adenosine A₁ receptors in immature brain is unclear. Adén et al. (2001) have suggested poor coupling to G-protein of this receptor at 7 days old post-natal. However, rats exposed during the neonatal period to CPA (*N*⁶-cyclopentyladenosine), an agonist of adenosine A₁ receptors, have reduced white matter, similarly to brain damage observed after hypoxia (Rivikees et al., 2001; Tumer et al., 2002).

Caffeine is able to cross all biological membranes and there are neither blood–brain nor placental barriers to caffeine (Fedholm et al., 1999). Maternal caffeine intake promotes controversial effects on the expression of adenosine receptors in mothers, fetuses and neonates (Adén et al., 2001; Léon et al., 2002). Considering the widespread intake of caffeine during pregnancy and the biological properties of caffeine, we investigated the locomotor activity and the effect of MK-801 in young rats submitted to the chronic caffeine exposure during gestational and post-natal life.

2. Material and methods

2.1. Caffeine treatment

Pregnant Wistar rats were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) and with free access to food and drinking water. Dams were treated with caffeine solution (1 g/l) from gestational day 1 onwards during the entire gestational and lactational period. Control pregnant rats received tap water. Pups submitted to caffeine treatment during the gestational and lactational period were divided in two groups: caffeine-treated group, which received caffeine up to 21 days old, and washout group, which received caffeine up to 7 days old. Control pups represented the third group. Experiments were performed with pups at 21 days old (34–38 g) between 9:00 a.m. and 4:00 p.m. (light phase). Procedures for the care and use of animals were adopted according to the regulations of Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), based on the guide

for the care and use of laboratory animals (National Research Council).

2.2. Locomotor activity assessment

Male rats were allocated to individual black wooden boxes (50 cm×30 cm×30 cm, 50 cm high) placed on the floor of a soundproof and diffusely illuminated room. Motor activity of eight rats was recorded simultaneously by a videocomputerized system, with image analysis at four frames per second. The software tracked the animals by distinguishing their white color from the black background of the floor, registering *X* and *Y* horizontal coordinates (Dall'Igna et al., 2003). MK-801 (0.25 mg/kg, 1 ml/kg) or saline was administered i.p. to rats after habituation to the boxes during 60 min and locomotor activity was recorded during the following 70 min.

2.3. Statistical analysis

Comparisons between locomotor activities at different time points were analyzed using General Linear Model (GLM) repeated measure (drug treatment versus time) with time as the repeated measure. Duncan's post hoc was used to determine the differences between specific groups. A value of $P < 0.001$ was considered significant.

3. Results

Caffeine or water consumption was estimated from the loss of water from drinking bottles. Caffeine intake of the caffeine-treated group was 206.51 ± 23.14 mg/day/kg of body weight and 223.90 ± 63.67 mg/day/kg of body weight for washout group. Tap water intake of control group was 209.45 ± 26.83 ml/day/kg of body weight. Fig. 1 shows locomotor activity of 21-day-old rats submitted to caffeine exposure during gestational and lactational periods. As shown in Fig. 1A, caffeine-treated group did not present alterations in spontaneous locomotion, which can be observed during habituation. As expected, MK-801 induced a significant time-dependent increase in locomotor activity compared to control group, starting 10 min after administration and lasting 70 min (Fig. 1A). However, the development of MK-801-induced hyperlocomotion was significantly reduced in caffeine-treated group (Fig. 1A and B) during the whole experiment. In order to observe if these effects were due to the cross-tolerance or promoted by adaptive changes induced by caffeine treatment, the locomotor activity of washout group was analyzed after the acute administration with MK-801. Interestingly, the results showed that washout group ($n=6$) presented a similar locomotor activity to caffeine-treated group after acute treatment with MK-801, maintaining a diminished response to this NMDA receptor antagonist (Fig. 1A and B). Significant main effects for treatment ($n=9$, $P < 0.001$,

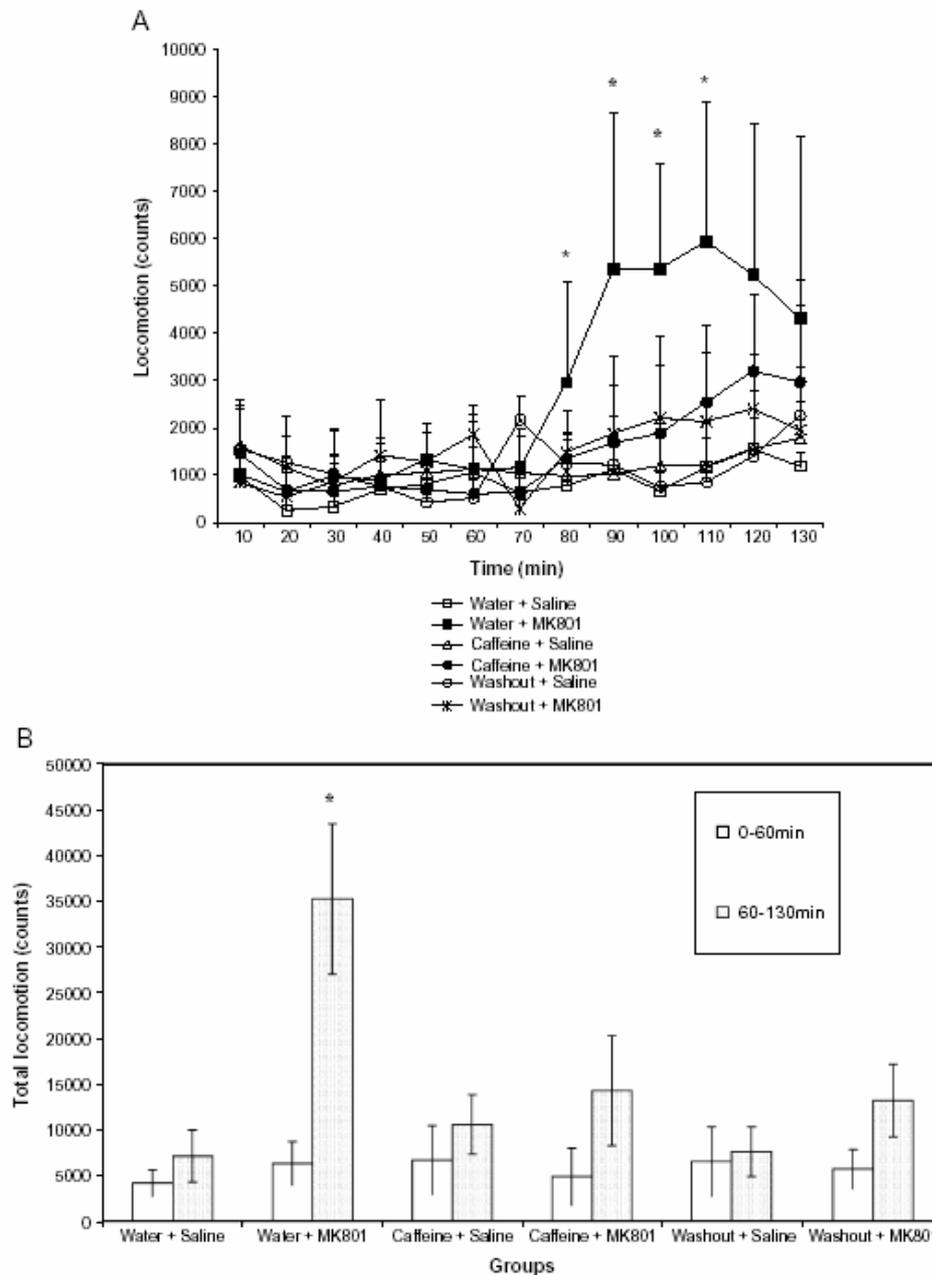


Fig. 1. Effect of maternal caffeine intake on MK-801-induced hyperlocomotion in pups. Control animals, animals that received caffeine (1 g/l) during the gestational period until 21 days old and animals that received the same dose of caffeine until 7 days old were tested when 21 days old. Pups were habituated for 60 min and received intraperitoneal injection of MK-801 (0.25 mg/kg) or saline, and their locomotor activity was assessed for 70 min. A: Locomotion in sets of 10 min. B: Total locomotion during habituation and after MK-801 treatment. Values represent mean \pm S.D. *Significant differences for all groups ($P < 0.001$, GLM repeated measure, post hoc Duncan).

$F_{5,42}=9.717$) and treatment and time interaction ($n=9$, $P < 0.001$; $F_{60,504}=4.465$) were found when comparing locomotor activities for different groups (Fig. 1A and B).

4. Discussion

This study showed that the chronic treatment with caffeine during gestational and lactational periods impairs

the hyperlocomotor response to the NMDA receptor antagonist, MK-801, without affecting normal locomotion. These effects reinforce the idea about the specific involvement of adenosine in locomotor alterations induced by MK-801 (Dall'igna et al., 2003). Furthermore, it is possible to suggest that permanent and adaptive changes occur in the brain exposed to caffeine during neurodevelopment, mainly involving a specific interaction between adenosine and NMDA receptors.

In the immature rat brain, adenosine receptor expression is quite similar to adult rat brain from the third week of post-natal life (Weaver, 1996). Investigations about the effect of adenosine receptor agonists during early post-natal period showed marked ventriculomegaly, demonstrating the susceptibility of immature brain to pharmacological interventions targeting the adenosinergic system (Rivikees et al., 2001; Turner et al., 2002).

The evaluation of NMDA receptor ontogeny showed immature receptors at the second week of post-natal life (Sircar, 2000). NMDA receptors play a relevant role in synaptic plasticity, being more sensitive in the neonatal than in the adult rat brain (Hestrin, 1992). One possible reason for this higher sensitivity of the developing brain could be a transient increase of NMDA receptor density in rat hippocampus at 6 and 10 days post-natal. The density of these receptors decreases at 13 days toward adult brain levels (Tremblay et al., 1988). Also, alterations in the functioning of regulatory/modulatory sites of NMDA receptor take place during neurodevelopment (Sircar, 2000).

The interaction between adenosine and the glutamatergic system has been investigated and adenosine is a known modulator of glutamate release (Sebastião and Ribeiro, 2000; Ciruela et al., 2001). Activation of adenosine A₁ and A_{2a} receptor reduces NMDA-receptor-mediated effects (De Mendonça and Ribeiro, 1997; Sebastião and Ribeiro, 2000). Reinforcing this assumption, activation of NMDA receptor induces adenosine release in the hippocampus (Manzoni et al., 1994) and striatum (Delaney et al., 1998).

The presence of immature NMDA receptors with higher sensitivity in the developmental brain may be related to the lack of MK-801-induced hyperlocomotion after maternal caffeine treatment. Caffeine exposure during the developmental period may promote an increased release of glutamate by lack of inhibitory tonus induced by adenosine. Taken together, the increased glutamate release and the high sensitivity of NMDA receptor in this phase could promote desensitization of NMDA receptor. This fact could induce the persistent lack of sensitization of NMDA receptors to MK-801 in animals treated with caffeine on the gestational period and first week of post-natal life.

Dall'Igna et al. (2003) have shown cross-tolerance between MK-801 and caffeine in adult mice. To control this cross-tolerance in our results, we performed a washout group, which received caffeine up to 7 days old and were tested 2 weeks later. The similar locomotor profile of washout group in relation to caffeine-treated animals reinforces the idea that the impairment of MK-801-induced hyperlocomotion results from enduring plastic changes rather than a simple pharmacological interaction. Dall'Igna et al. (2003) proposed that a possible mechanism for the stimulant effect of MK-801 is to induce an abrupt reduction of adenosine tone, which would not be relevant after chronic caffeine treatment. Therefore, both results may be related and underscore the important modulating role of adenosine on the glutamatergic system at least in terms of locomotor behavior.

In summary, maternal caffeine intake can induce changes in the immature central nervous system, which are persistent in the young phase even after caffeine withdrawal. Such changes can be related to a deficit in neuromodulation exerted by adenosine in this intense phase of formation of neural connections. An altered inhibitory tonus of adenosine in this condition could facilitate the release of several neurotransmitters, such as glutamate. These results reinforce the influence of adenosine during mammalian neurodevelopment, with implications for the adult behavioral in response to NMDA receptor antagonists, particularly in locomotor activity.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. João José Freitas Sarkis for the critical review of the manuscript. This work was supported by CNPq and PRONEX.

References

- Adén, U., Leverin, A.-L., Hagberg, H., Fredholm, B.B., 2001. Adenosine A(1) receptor agonism in the immature rat brain and heart. *Eur. J. Pharmacol.* 426, 185–192.
- Andine, P., Widemark, N., Axelsson, R., Nyberg, G., Olofsson, U., Martensson, E., Sandberg, M.J., 1999. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1393–1408.
- Browne, R.G., Welch, W.M., 1982. Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science* 217, 1157–1159.
- Ciruela, F., Escriche, M., Burgueno, J., Ángulo, E., Casado, V., Soloviev, M.M., Canela, E.I., Mallol, J., Chan, W.Y., Lluís, C., Mellinny, R.A., Franco, R., 2001. Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A₁ receptors assemble into functionally interacting complexes. *J. Biol. Chem.* 276 (21), 18345–18351.
- Dall'Igna, O.P., Da Silva, A.L., Dietrich, M.O., Hoffmann, A., de Oliveira, R.V., Souza, D.O.G., Lara, D.R., 2003. Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice. *Psychopharmacology* 166, 258–263.
- De Mendonça, A., Ribeiro, J.A., 1997. Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci.* 60 (4–5), 245–251.
- Delaney, S.M., Shepel, P.N., Geiger, J.D., 1998. Levels of endogenous adenosine in rat striatum: II. Regulation of basal and *N*-methyl-D-aspartate-induced levels by inhibitors of adenosine transport and metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 561–567.
- Fredholm, B.B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A., Zvartau, E.E., 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51, 83–133.
- Hestrin, S., 1992. Different glutamate receptor channels mediate fast excitatory synaptic currents in inhibitory and excitatory cortical neurons. *Nature* 357, 686–689.
- Karcz-Kubicha, M., Antoniou, K., Terasmaa, A., Quarta, D., Solinas, M., Justinova, A., Pezzola, A., Regio, R., Müller, C.E., Fuxe, K., Goldberg, S.R., Popoli, P., Ferre, S., 2003. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. *Neuropsychopharmacology* 28, 1281–1291.

- Léon, D., Albasanz, J.L., Ruíz, M.A., Fernández, M., Martín, M., 2002. Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J. Neurochem.* 82, 625–634.
- Manzoni, O.J., Manabe, T., Nicoll, R.A., 1994. Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 265, 2098–2101.
- Rimondini, R., Ferre, S., Ogren, S.O., Fuxe, K., 1997. Adenosine A2A agonists: a potential new type of atypical antipsychotic. *Neuropsychopharmacology* 17, 82–91.
- Rivikees, S.A., Zhao, Z., Porter, G., Tumer, C., 2001. Influences of adenosine on the fetus and newborn. *Mol. Genet. Metab.* 74, 160–171.
- Sebastião, A.M., Ribeiro, J.A., 2000. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *TIPS* 21, 341–346.
- Sirear, R., 2000. Developmental maturation of the *N*-methyl-D-aspartic acid receptor channel complex in postnatal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18, 121–131.
- Tremblay, E., Roisin, M.P., Represa, A., Charriaut-Marlangue, C., Ben-Ari, Y., 1988. Transient increased density of NMDA binding sites in the developing rat hippocampus. *Brain Res.* 461, 393–396.
- Turner, C.P., Yan, H., Schwartz, M., Othman, T., Rivikees, S.A., 2002. A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss. *Dev. Neurosci.* 13, 1199–1204.
- Weaver, D.R., 1996. A1-adenosine receptor gene expression in fetal rat brain. *Dev. Brain Res.* 94, 205–223.

II.3. CAPÍTULO 3 – Da Silva, R. S.; Tonial, E. M.; Dalmaz, C.; Torres, I. L. da S.; Lara, D. R.; Bonan, C. D. **Changes in the nociceptive response of rats submitted to long-term caffeine intake.** Submetido ao Periódico Pharmacology Biochemistry and Behavior.

ORIGINAL ARTICLE

CHANGES IN THE NOCICEPTIVE RESPONSE OF RATS SUBMITTED TO LONG-TERM CAFFEINE INTAKE

Rosane Souza da Silva^{1, 2*}, Elisa Marchezan Tonial², Carla Dalmaz¹, Iraci Lucena da Silva Torres³, Diogo R. Lara², Carla Denise Bonan².

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Centro Universitário UNIVATES, Rua Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, Lajeado, RS, Brazil.

*Corresponding Author

Rosane Souza da Silva, Laboratório de Pesquisa Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

FAX: +55 51 3320 3612 Phone: +55 51 3320 3545 (Extension 4158)

E-mail: rosanebio@yahoo.com.br

Running title: Maternal caffeine intake and nociception

ABSTRACT

Here we evaluate the effect of maternal caffeine intake on nociception in young and adult rats. Pregnant Wistar rats received drinking water or caffeine (1g/l) during gestational and lactational period. Pups were divided into three groups: caffeine-treated (CAF), washout (WAS), which received caffeine up to 7 days before the experimental day and control (CTRL) that received tap water. Experiments were performed with male pups at 14 (P14) and 50 (P50) days of age. Basal nociceptive threshold at P14 and P50 and the stress-induced analgesia (SIA) (at P50) were evaluated by a tail-flick test. CAF group at P14 developed a higher basal nociceptive threshold than CTRL and WAS groups. All groups presented a similar basal nociceptive threshold at P50. However, the SIA in adult rats was similar only between CTRL and CAF groups. The WAS group presented a reduced analgesic response to stress. These findings pointed to a direct effect of adenosine receptor blockade on nociception in young rats, which is abolished in adult rats probably by an adaptative mechanism, such as up-regulation of adenosine receptors. The lack of caffeine effects on the SIA in adult rats may be related to a preservation of opioid receptor activity after long-term caffeine intake.

Keywords: adenosine; analgesia; caffeine; development; nociception; stress.

1. INTRODUCTION

Caffeine is a xanthine with psychostimulant effects commonly found in a variety of beverages and food. The biochemical basis for the effects promoted by caffeine is the blockade of adenosine receptors (Fredholm et al., 1999). Once in the extracellular space, adenosine acts via specific G - protein-coupled receptors that include A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ adenosine receptors (Fredholm et al., 2001). The physiological activation of adenosine receptors exerts a modulatory role on several neurotransmitter systems, such as glutamatergic, dopaminergic and cholinergic (Sebastião and Ribeiro, 2001). Among their effects, adenosine A₁ and A_{2A} receptors mediate inhibition or facilitation of neurotransmitter release, respectively (Dunwiddie and Masino, 2001; Fredholm et al., 2001).

Studies on the effect of adenosine receptor agonists during early post-natal period showed marked ventriculomegaly, reductions in white matter volume and neuronal loss, which indicates the susceptibility of immature brain to pharmacological interventions related to the adenosinergic system (Rivkees et al., 2001; Turner et al., 2002). Methylxantines are among the most prescribed drugs in neonatal medicine, mainly as modulators of respiratory activity (Millar and Schimidt, 2004). The susceptibility of immature brain to caffeine has particular relevance since there are no biological barriers to caffeine and this drug is widely consumed during pregnancy (Fredholm et al., 1999). The effects of maternal caffeine intake on physiological and behavioral parameters in fetus are controversial. Caffeine exposure during gestational and/or lactational periods shows influence on natural and induced locomotion and emotional reactivity of males and females (Guillet, 1990; Hughes and Beveridge, 1991). The total number of A₁ adenosine receptors of fetus exposed to maternal caffeine intake was decreased and associated with a significant increase in the affinity of these

receptors (León et al., 2002). However, there is no consensus in the literature, since both up regulation and down-regulation of these receptors have been observed after maternal caffeine intake (Guillet and Kellog, 1991; Adén et al, 2000; León et al., 2002).

It has been proposed that the activation of adenosine receptors is involved in physiological pain transmission at the spinal cord level and in opioid antinociception (Cahill et al., 1995; Sawynok, 1998; Sawynok and Liu, 2003). Activation of μ , but not δ and κ opioid receptors, promote adenosine release (Cahill et al., 1995). Animal studies have demonstrated adenosine-mediated inhibitory influences on presumed nociceptive reflex responses (Sawynok, 1998), possibly through adenosine A₁ receptors (Keil and DeLander, 1996). Adenosine analogs have antinociceptive properties in experimental and clinical situations, including neuropathic pain, where pain-signaling mechanisms have been altered (Jarvis and Kowaluk, 2001; Sawynok, 1998; Torres et al., 2003). However, caffeine, a non-selective antagonist of adenosine receptors, has intrinsic antinociceptive properties and is used as adjuvant analgesic drug (Sawynok and Yaksh, 1993). Antinociception promoted by caffeine appears paradoxical. It has been assumed that this effect can be due to an inhibitory action on presynaptic adenosine receptors, producing an increase of acetylcholine in cholinergic nerve terminals, while adenosine analogs act at postsynaptic adenosine receptors (Ghelardini et al., 1997; Sawynok and Reid, 1996). On the other hand, the spinal administration of methylxanthines inhibits spinal analgesia by morphine (DeLanders and Hopkins, 1986) and μ opioids. However, it has been described that levels of opioid receptors are either increased (δ) or unaltered (μ , κ and σ) in cortical membranes after chronic caffeine ingestion (Shi et al., 1994).

It is well known that individuals exposed to acute stressful conditions, such as restraint, present an increase in pain threshold called stress-induced analgesia (SIA), which can be mediated by either opioid or nonopioid receptors (Amir and Amit, 1979;

Blustein et al., 1995; Bodnar, 1986). Since methylxanthines affect opioid analgesia, manipulations of the adenosinergic system may also lead to different responses to stress situations, concerning SIA.

Considering that (i) maternal caffeine intake is not avoided during gestational and lactational periods; (ii) adenosine receptor activation modulates the nociception signalling and (iii) changes in somatosensory nervous system occur after birth and determine pain and sensory processing at each developmental stage, the aim of this study is to evaluate if rats exposed to caffeine during gestational and neonatal life alter their nociceptive response to a thermal noxious stimulus.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals and caffeine treatment

Pregnant Wistar rats (n=12) were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 7.00 a.m.) and with free access to food and drinking water or caffeine. Dams were treated with caffeine solution (1g/l) from gestation day 1 onwards during the entire gestational and lactational period. Control pregnant rats received tap water. Male pups submitted to caffeine treatment during the gestational and lactational period were divided in two groups: caffeine-treated group (CAF), which received caffeine up to experimental day, and washout group (WAS), which received caffeine up to 7 days before the experimental day. Control pups represent the third group (CTRL). Experiments were performed with the pups at 14 (P14) or 50 (P50) days of age. For the P50 group, pups were separated from dams at 21 days of age and continued the treatment with caffeine solution (1g/l). All behavioural experiments were in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Tail-flick measurement

Nociception was assessed with the tail-flick apparatus (D'Amour and Smith, 1941). Rats were wrapped in a towel and placed on the apparatus. The light source positioned below the tail was focused on a point 2 - 3 cm rostral at the tip of the tail. Deflection of the tail activated a photocell and automatically terminated the trial. The tail-flick latency represented the period of time (s) from the beginning of the trial to the tail deflection. Light intensity was adjusted so to obtain baseline tail-flick latencies of 3 to 4 s (0.4 mA to P14 and 0.7 mA and P50). Light intensity used for P14 was lower than P50 because nociceptive threshold to thermal stimulation is reduced in newborn rats (Sternberg et al., 2004). A cut-off time of 10 s was used to prevent tissue damage. Animals were pre-exposed to the tail-flick apparatus for habituation with the procedure, since the novelty of the apparatus can itself induce antinociception (Netto et al, 1987).

2.3. Acute restraint stress procedure

Animals were stressed by a 1h restraint at 50 days of age (Ely et al, 1997) by placing the animal in a 25 x 7-cm plastic tube and adjusting it with plaster tape on the outside, so that the animal was unable to move. There was a 1-cm hole in the far end for breathing. The control group was not submitted to stress and animals were kept in their home cages. The immobilization procedure was always performed between 10:00 a.m. and 1:00 p.m. The tail-flick measure was conducted before and after the acute restraint stress procedure as describe above.

2.4. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm S.E.M and mean \pm S.D for time latency and caffeine intake, respectively. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni test when $P < 0.05$.

3. RESULTS

Caffeine intake of dams during the gestational and lactational periods (up to 14 days post-natal) was 227.7 ± 59.2 mg/day/kg and 182.2 ± 25.1 mg/day/kg of body weight for CAF and WAS group, respectively. At P50, caffeine intake was 166.15 ± 16.61 and 194.5 ± 32.78 mg/day/kg of body weight for CAF and WAS groups, respectively. The CTRL group presents a general tap water intake of 210 ± 26.83 ml/day/kg of body weight. Daily water intake in all groups of rats was not significantly different during the period of study ($p=0.152$).

Regarding tail-flick measurements, rats from CAF group at P14 showed a higher latency than CTRL (CAF, $n= 25$; 5.11 ± 1.32 s; CTRL, $n= 12$; 3.04 ± 0.21 s) and WAS group (WAS, $n= 8$; 3.58 ± 0.92) [$F(2;43)=15.581$, $P<0.01$] (Fig. 1A). This increase indicates that caffeine promotes an analgesic effect in this developmental phase.

To observe if this analgesic effect of caffeine remains during the development, we evaluated nociception in rats at P50, which received caffeine during the gestation and lactation period until experimental day. The results demonstrated similar time latencies of CAF ($n=6$; 4.79 ± 0.47 s) in relation to the CTRL ($n=8$; 4.61 ± 0.25 s) and WAS ($n=6$; 4.84 ± 0.49 s) groups [$F(2;17)=0.106$, $P=0.9$] (Fig. 1B).

Considering the lack of caffeine effects in rats at 50 days of age, we evaluated the development of analgesia induced by stress in these animals. The latency before 1 hour of restraint was similar between all groups (CTRL, CAF and WAS, $P=0.9$). Restraint stress produced a strong analgesic response for the CAF ($n=6$; 8.47 ± 0.75 s) and CTRL groups ($n=8$; 9.31 ± 0.30 s). Latency values from the WAS group ($n=6$; 6.30 ± 1.17 s) were not significantly different from the CAF group (Fig. 2), but were significantly lower than the CTRL group after restraint [$F(2;17)=4.272$, $P<0.05$].

4. DISCUSSION

In this study we showed that rats receiving caffeine during the prenatal period and until the 14 days of age developed increased antinociception. This effect appears to be a direct action of caffeine since it was abolished when caffeine was withdrawn. Caffeine has been regarded as a co-adjuvant of anti-inflammatory drugs, such as aspirin, and their intrinsic antinociceptive action is a target of pharmacological studies (Sawynok and Reid, 1996).

Previous studies have shown antinociceptive effects for caffeine (Jarvis and Kowaluk, 2001; Sawynok, 1998). Caffeine has distinct affinities for adenosine receptors, exhibiting a K_d of $8.1\mu\text{M}$ for A_{2A} , $17\mu\text{M}$ for A_{2B} , $20\mu\text{M}$ for A_1 and $190\mu\text{M}$ for A_3 in rats (Fredholm et al., 1999). Adenosine, mainly by A_1 receptors, can alter pain transmission by actions on both nociceptive afferent and transmission neurons (Sawynok and Liu, 2003). Actions mediated by adenosine A_{2a} , A_{2b} and A_3 receptors also occur and can produce different effects on pain transmission (Sawynok and Liu, 2003). Activation of adenosine A_1 receptors located in spinal cord dorsal horn transmission neurons or interneurons may result in postsynaptic inhibition of excitatory transmission due to activation of K^+ channels and hyperpolarization, inducing analgesic effects (Li and Perl, 1994; Patel et al., 2001; Salter et al., 1993). The presence of A_{2A} in the spinal cord and their relation to pain transmission is still controversial (Sawynok and Liu, 2003). There are several studies indicating the presence of A_{2A} receptors in the dorsal horn of spinal cord and an up-regulation of A_{2A} receptors was verified following spinal ischemia, however, their relation to pain transmission is still controversial (Cassada et al., 2002; Choca et al., 1988; DeLanders and Hopkins, 1987; Patel et al., 2001; Sawynok and Liu, 2003). In electrophysiological studies in spinal cord slices the administration of CGS21680, an A_{2A} receptor agonist, was devoid of activity (Keil and

DeLander, 1996) or exhibited a mix of stimulatory and inhibitory effects (Patel et al., 2001).

A₁ and A_{2A} adenosine receptors have opposite effects and a “cross-talk” is attributed to these receptors (Cunha, 2001a). Thus, activation of A_{2A} adenosine receptors attenuates A₁ receptor inhibition, and a specific antagonist of A_{2a} receptor abolishes this effect (Lopes et al., 1999). This effect was observed in young (six weeks) but not in old rats. Considering the high affinity of caffeine by A_{2A} receptors, a possible factor to explain, at least in part, the antinociceptive effect of caffeine may be the lack of this “cross-talk” between these receptors, favoring an antinociceptive response by A₁ adenosine receptor. Caffeine-withdrawal during the 7 days prior to test could promote a reestablishment of adenosinergic tonus, leading pain threshold back to normal. Our results demonstrated antinociceptive properties promoted by caffeine in newborn rats submitted to gestational and lactational caffeine exposure. Additionally, no tolerance was observed in these animals to the antinociceptive effect of caffeine, which could be a suggestion that these young animals could be less susceptible to caffeine-induced tolerance, at least concerning this antinociceptive effect.

No effect of chronically administered caffeine was observed in rats at 50 days of age. Therefore, contrary to the effects observed in 14 days-old rats, caffeine administered until 50 days of age leads to tolerance to its analgesic effect. This lack of effect may be a physiological response to the prolonged administration of an adenosine receptor antagonist related to changes in the adenosinergic system during development, or may represent an adaptive mechanism in order to recover the balance related to adenosine receptor activation and modulation of pain in spinal cord.

Several studies support the hypothesis that adenosine is involved in opioid-induced antinociception. Since stress-induced analgesia (SIA) presents a strong opioid

component, and since adenosine A₁ receptors have been proposed to exist as a part of a μ opioid and α_2 -adrenergic multireceptor complex on the basis of a demonstrated cross antagonism, cross tolerance and cross withdrawal between these systems (Aley and Levine, 1997), we hypothesized that animals chronically treated with caffeine may present cross tolerance with the opioid receptor function, leading to a lower antinociception in response to stress exposure. In this study, whilst exposure to chronic stress induced an analgesic response in the CTRL group and CAF group, a lower effect was observed when it was administered the WAS group. The absence of difference between CTRL and CAF groups suggest that chronically treated animals, although presenting a different threshold to pain in early life (14 days of age) regain, as adults, a balance between system controlling pain and are able to respond in an adequate way to a stressor with an antinociceptive response. Chronic exposure to caffeine could induce an adaptative response in these animals, which could lead to an up regulation of adenosine receptors (Johansson et al., 1993; Ralevic and Burnstock, 1998). This adaptative response, however, does not appear to interfere in other systems involved in the expression of antinociception in response to stress, suggesting a preservation of opioid receptor activity after long-term caffeine intake. On the other hand, the WAS group presented a lower response to stress. This result suggest that there are plastic alterations induced by caffeine exposure since gestation and through adult life, which exacerbate one week after caffeine is removed from the diet, at least concerning the response to stress. Additionally, since adenosine receptors have been linked to anxious behavior (Giménez-Llort et al., 2002), it is possible that this treatment interferes with perceiving something as a stressor, and therefore these animals could respond in a less intensive way to restraint. Further studies are required to evaluate the mechanism induced by long-term caffeine treatment on stress responses and emotional behavior.

In conclusion, the treatment of caffeine from gestational period promotes alterations on the regulation of pain. We can divide the main findings of this investigation in two points: (1) young rats submitted to caffeine treatment have an enhancement of pain threshold, which is lost in adult life, probably by a reestablishment of the balance of adenosine receptor activation; (2) stress induced-analgesia is not altered by caffeine treatment, which may be related to an independent action between the analgesia induced by adenosine or opioids. However, 7 days of withdrawal after long-term caffeine exposure alter the response to stress. This study provides additional support to the controversial question about caffeine intake during developmental period, indicating the nociception as a parameter that is altered by gestational caffeine intake.

ACKNOWLEDGEMENT

CNPq and PRONEX supported this work.

REFERENCES

1. Adén, U, Herlenius, E, Tang, L-Q, Fredholm, B B. Maternal caffeine intake has minor effects on adenosine receptor ontogeny in the rat brain. *Pediatr. Res.* 2000; 48 (2): 177-183.
2. Aley, K O, Levine, J D. Multiple receptors involved in peripheral α_2 , μ , and A_1 antinociception, tolerance and withdrawal. *J. Neurosci.* 1997; 17 (2): 735-744.
3. Amir, S, Amit, Z. Enhanced analgesic effects of stress following chronic administration of naltrexone in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1979; 59 (1-2): 137-40.
4. Blustein, J E, Hornig, G, Bostwick-Poli, M. Role of contextual stimuli in tolerance to stress-induced analgesia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995; 52 (4): 841-844.
5. Bodnar, R J. Neuropharmacological and neuroendocrine substrates of stress-induced analgesia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1986; 467: 345-60.
6. Cahill, C M, White, T D, Sawynok, J. Spinal opioid receptors and adenosine release: neurochemical and behavioral characterization of opioid subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 275 (1): 84-93.
7. Cassada, D C, Tribble, C G, Long, S M, Kaza, A K, Linden, J, Rieger, J M, Rosin, D, Kron, I L, Kern, JÁ. Adenosine A_2A agonist reduces paralysis after spinal cord ischemia: correlation with A_2A receptor expression on motor neurons. *Ann. Thorac. Surg.* 2002; 74(3): 846-50.
8. Choca, J I, Green, R D, Proudfit, H K. Adenosine A_1 and A_2 receptors of the substantia gelatinosa are located predominantly on intrinsic neurons: an autoradiography study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; 247 (2): 757-64.

9. Cunha, R A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 2001; 38 (2): 107-25.
10. D'Amour, F E, Smith, D L. A method for determining loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1941; 72: 74-79.
11. DeLanders, G E, Hopkins, C J. Spinal adenosine modulates descending antinociceptive pathways stimulated by morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986; 239: 88-93.
12. DeLanders, G E, Hopkins, C J. Involvement of A₂ adenosine receptors in spinal mechanisms of antinociception. *Eur. J. Pharmacol.* 1987; 139 (2): 215-23.
13. Dunwiddie, T V, Masino, S A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001; 24: 31-55.
14. Ely, D R, Dapper, V, Marasca, J, Correa, JB, Gamaro, G D, Xavier, M H, Michalowski, M B, Catelli, D, Rosat, R, Ferreira, M B, Dalmaz, C. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol. Behav.* 1997; 61(3): 395-8.
15. Fredholm, B B, Battig, K, Holmen, J, Nehlig, A, Zvartau, E E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 1999; 51: 83-133.
16. Fredholm, BB, Ijzerman, A P, Jacobson, K A, Klotz, K N, Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 527-552.
17. Ghelardini, C, Galeotti, N, Bartolini, A: Caffeine induces central cholinergic analgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1997; 356 (5): 590-5.
18. Giménez-Llort, L, Fernández-Teruel, A, Escorihuela, R M, Fredholm, B B, Tobeña, A, Pekny, M, Johansson B. Mice lacking the adenosine receptor are anxious and

- aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 16: 547-550.
19. Guillet, R, Kellog, C. Neonatal exposure to therapeutic caffeine alters the ontogeny of adenosine A₁ receptors in brain of rats. *Neuropharmacol.* 1991; 30 (5): 489-496.
 20. Guillet, R. Neonatal caffeine exposure alters adenosine receptor control of locomotor activity in the developing rat. *Dev. Pharmacol. Ther.* 1990; 15: 94-100.
 21. Hughes, R N, Beveridge, I J. Behavioral effects of exposure to caffeine during gestation, lactation or both. *Neurotoxicol. Teratol.* 1991; 13: 641-647.
 22. Jarvis, M F, Kowaluk, E A. Pharmacological characterization of P2X₃ homomeric and heteromeric channels in nociceptive signaling behavior. *Drug Dev. Res.* 2001; 52: 220-231.
 23. Johansson, B, Ahlberg, S, Ploeg, I van der, Brené, S, Lindefors, N, Persson, H, Fredholm, B B. Effect of long term caffeine treatment on A₁ and A₂ adenosine receptor binding and on mRNA levels in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1993; 347: 407-414.
 24. Keil, G L, DeLander, G E. Altered sensory behaviors in mice following manipulation of endogenous spinal adenosine neurotransmission. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 312: 7-14.
 25. Lao, L J, Kumamoto, E, Luo, C, Furue, H, Yoshimura M. Adenosine inhibits excitatory transmission to substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord through the activation of presynaptic A₁ adenosine receptor. *Pain* 2001; 94 (3): 315-24.
 26. León, D, Albasanz, J L, Ruíz, M A, Fernández, M, Martín, M. Adenosine A₁ receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J. Neurochem.* 2002; 82: 625-634.

27. Li, J, Perl, E R. Adenosine inhibition of synaptic transmission in the substantia gelatinosa. *J. Neurophysiol.* 1994; 72 (4): 1611-1621.
28. Lopes, LV, Cunha, R A, Ribeiro, J A. Cross-talk between A₁ e A_{2A} adenosine receptors in the hippocampus and córtex of Young adult and old rats. *J. Neurophysiol.* 1999; 82, 3196-3203.
29. Millar, D, Schimidt, B. Controversies surrounding xanthine therapy. *Sem. Neonatol.* 2004; 9: 239-244.
30. Netto, C A, Siegfried, B, Izquierdo, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressfull stimulation. *Behav. Neural. Biol.* 1987; 48: 304-309.
31. Patel, M K, Pinnock, R D, Lee, K. Adenosine exerts multiple effects in dorsal horn neurones of the adult rat spinal cord. *Brain. Res.* 2001; 920 (1-2): 19-26.
32. Ralevic, V, Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50 (3): 413-92.
33. Rivkees, S A, Zhao, Z, Porter, G, Turner, C. Influences of adenosine on the fetus and newborn. *Mol. Genet. Metab.* 2001; 74: 160-171.
34. Salter, M W, De Koninck, Y, Henry, J L. Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Prog. Neurobiol.* 1993; 41 (2): 125-56.
35. Sawynok, J. Adenosine receptor activation and nociception. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 317: 1-11.
36. Sawynok, J, Liu, X J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog. Neurobiol.* 2003; 69: 313-340.
37. Sawynok, J, Reid, A. Neurotoxin-induced lesions to central serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems modify caffeine-induced antinociception

- in the formalin test and locomotor stimulation in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 277 (2): 646-53.
38. Sawynok, J, Yaksh, T L. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol. Rev.* 1993; 45 (1): 43-85.
39. Sebastião, A M, Ribeiro, J A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *TIPS.* 2000; 21, 341-346.
40. Shi, D, Nikodijevic, O, Jacobson, K A, Daly, J W. Effects of chronic caffeine on adenosine, dopamine and acetylcholine systems in mice. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1994; 328 (3): 261-87.
41. Sternberg, W F, Smith, L, Scorr, L. Nociception and antinociception during the first week of life in mice: sex differences and test dependence. *J. Pain.* 2004; 5 (8): 420-426.
42. Torres I L S, Bonan C D, Crema L, Nunes M L, Battastini A O, Sarkis J J F, Dalmaz C, Ferreira M B: Effects of drugs active at adenosine receptors upon chronic stress-induced hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 481: 197-201, 2003.
43. Turner C P, Yan H, Schwartz M, Othman T, Rivkees S A: A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss. *NeuroReport* 13:1199-1204, 2002.

Legend to Figures

Fig. 1. Effect of caffeine treatment on the basal nociceptive threshold. A: Young rats (P14); B: Adult rats (P50). CTRL group received water; CAF group received caffeine 1g/l and WAS group received caffeine 1g/l up to 7 days before the experimental day. Values are means \pm S.E.M. * $P < 0.01$ different from CTRL and WAS groups.

Fig. 2. Effect of caffeine treatment on the stress-induced analgesia. CTRL group received water; CAF group received caffeine 1g/l and WAS group received caffeine 1g/l up to 7 days before the experimental day. Values are means \pm S.E.M. White bars correspond to latency time before restraint (PRE) and black bars correspond to latency time after (POS) 60 minutes of restraint. * $P < 0.05$ different from CTRL group.

Fig. 1

A

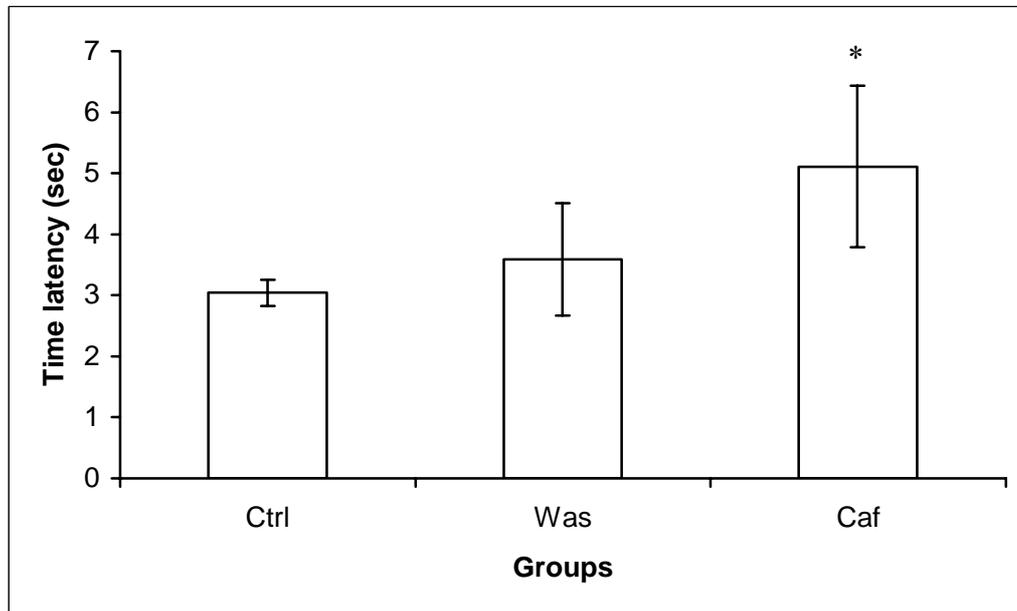


Fig. 1

B

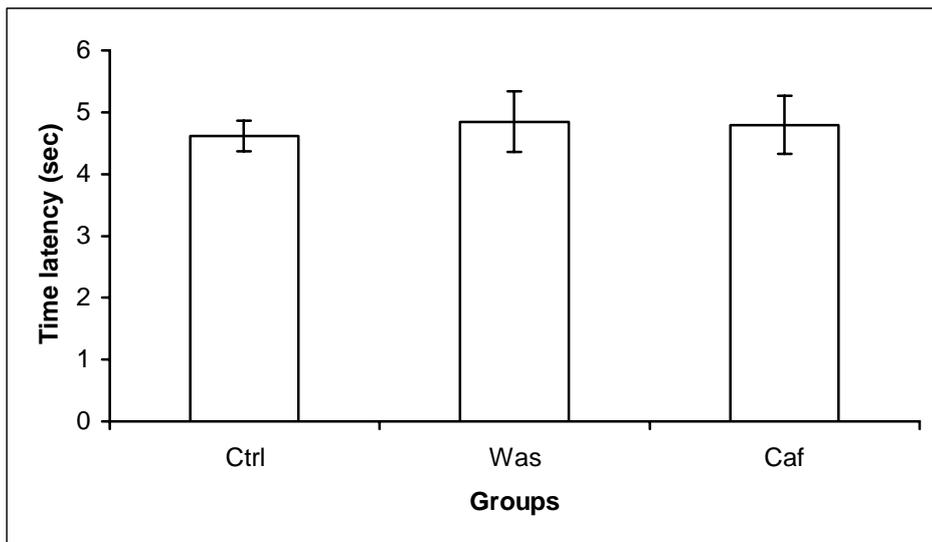
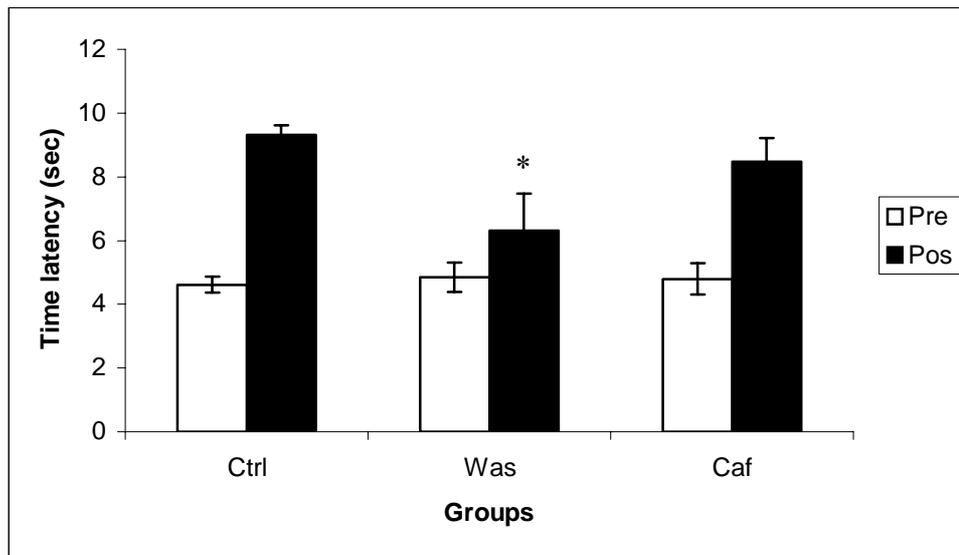


Fig. 2



II.4. CAPÍTULO 4 - Da Silva, R.S.; Silveira, V. G. da; Tonial, E. M.; Battastini, A. M. O.; Sarkis, J. J. F.; Lara, D. R.; Bonan, C. D. **Effects of maternal caffeine intake on nucleotides and acetylcholine degradation in hippocampus of neonate rats.**
Submetido ao periódico Brain Research Bulletin.

ORIGINAL ARTICLE

Effects of maternal caffeine intake on nucleotides and acetylcholine degradation in hippocampus of neonate rats.

Rosane Souza da Silva^{1, 2*}, Vanessa Gass da Silveira¹, Elisa Marchezan Tonial², Ana Maria Oliveira Battastini¹, João José Freitas Sarkis¹, Diogo R. Lara², Carla Denise Bonan².

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding Author

Rosane Souza da Silva, Laboratório de Pesquisa Bioquímica, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

FAX: +55 51 3320 3612 Phone: +55 51 3320 3545 (Extension 4158)

E-mail: rosanebio@yahoo.com.br

Running head: Caffeine on NTPDase and AChE in neonates

ORIGINAL ARTICLE

Effects of maternal caffeine intake on nucleotides and acetylcholine degradation in hippocampus of neonate rats.

Running head: Caffeine on NTPDase and AChE in neonates

ABSTRACT

Nervous terminals from central and peripheral nervous system, such as dopaminergic, serotonergic and cholinergic nervous terminals, release ATP as a co-transmitter.

Nucleotidase enzymes (E-NTPDases and 5'-nucleotidase) play the inactivation of ATP signaling, promoting adenosine production, an important neuromodulator. The

immature brain is sensitive to intervention in the adenosinergic system, such as maternal caffeine intake, since that caffeine is an unspecific blocker of adenosine receptors.

Considering the co-release of ATP and acetylcholine and that ATP degradation by ecto-nucleotidases is the main source of extracellular adenosine, we evaluated the effects of

rat maternal caffeine intake (1g/l) on acetylcholine and nucleotides degradation in

hippocampus of neonates at ages of 7, 14 and 21 days in caffeine-treated and control

groups. ATP, ADP and AMP hydrolysis predominantly decreased during rat brain

development. Caffeine treatment decreased ATP hydrolysis at 7 (19%) and 14 (57%)

days of age and increased AMP hydrolysis (75% and 32%, respectively) at these ages.

All groups presented an age-dependent increase on acetylcholinesterase (AChE)

activity. The caffeine-treated group had the highest AChE activity (42%) when

compared to control group at 21 days of age. These results confirm that modifications

on these enzyme activities occur during neurodevelopment and that caffeine treatment

of dams can alter neurotransmitter degradation, as well as the extracellular adenosine

production pathway of their pups.

Keywords: acetylcholinesterase; adenosine; caffeine; development; nucleotides;

NTPDase.

1. Introduction

ATP is co-released with several neurotransmitters in neurons from central and peripheral nervous system, acting as a fast neurotransmitter [9]. Dopamine, glutamate, nitric oxide, serotonin, acetylcholine and others neurotransmitters are stored and released with ATP (for review see [9]). Extracellular ATP evokes responses through two general classes of extracellular receptors, the ionotropic P2X receptors and the metabotropic P2Y receptors [26]. ATP degradation to adenosine is played by a cascade of enzymes, composed by E-NTPDases (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) and an ecto-5'-nucleotidase [31]. Ecto-5'-nucleotidase is the rate-limiting enzyme of the cascade, controlling the production of adenosine, an important neuromodulator [5; 12; 16; 31]. The activation of high affinity adenosine receptors, A₁ and A_{2A}, is able to inhibit or stimulate neurotransmitter release, respectively [13].

Cholinergic and purinergic systems closely interact. Acetylcholine and ATP are co-released and central cholinergic neurons undergo strong adenosine modulation, mainly via adenosine A₁ and A_{2A} receptors. Striatal cholinergic nerve terminals exhibit inhibition of acetylcholine release when adenosine A₁ receptor is activated and, in synaptosomal fractions obtained from these neurons, acetylcholine release is stimulated after activation of adenosine A_{2A} receptor [7; 19; 22].

Acetylcholinesterase activity controls acetylcholine levels in the synaptic cleft, presenting a broad distribution on central and peripheral nervous systems [24]. The presence of nucleotidases and acetylcholinesterase activities, as well as receptors for nucleotides and acetylcholine in early phases of neurodevelopment, has been documented. Acetylcholinesterase activity from rat brain increases in a time-dependent manner after birth and attains stability at 21 days of neonatal life [24]. ATP and ADP hydrolysis seem to undergo a slight reduction throughout the first two months [8]. At 18

days of fetal life, there is a pattern of adenosine receptor distribution similar to adult rats [30]. Ventriculomegaly, reduction in white matter volume and neuronal loss were detected after activation of adenosine receptors during the first two weeks of neonatal life, which raises the question about the role of adenosine in immature brain [27; 29].

Caffeine is a behavioral stimulant largely consumed through many beverages and food, which is not avoided during pregnancy. The behavioral effects of caffeine follow a biphasic dose-response pattern in humans and animals behavior, with low doses acting as stimulant and high doses being depressant [18]. The biochemical basis that underlies caffeine effects is the blockade of adenosine receptors, disrupting adenosine modulation. Thus, the effects of caffeine during gestational and neonatal period represent an important question considering the broad actions modulated by adenosine, mostly in these intense phases of neuronal growing and connection. Moreover, chronic treatment with caffeine has been shown to produce a slight increase in adenosine receptor expression [3; 20; 21].

Considering the susceptibility of immature brain to adenosine receptor activation and the role of enzymatic activities to modulate the purinergic and cholinergic systems, which interact in the hippocampus, the aim of this investigation is to evaluate the effects of maternal caffeine intake during gestational and lactational time on nucleotide hydrolysis and acetylcholinesterase (AChE) activities of neonate rats.

2. Material and Methods

Chemicals

Caffeine, ATP, ADP, AMP, DTNB (5,5'- dithiobis-2-nitrobenzoic acid), acetylthiocholine iodide and Trizma Base were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All others chemicals were of analytical grade.

Animals

Thirty adult females Wistar rats (weighting approximately 220g) and their pups were utilized to perform all experiments. The female rats were allocated with male rats with free access to food and drinking water. The male rats were removed from the cage after breeding. The pregnant rats were divided in two groups related with treatment received: (1) Control group, which received tap water and (2) Caffeine group, which received caffeine 1.0g/l diluted in tap water. The pups were killed by decapitation at 7, 14 and 21 days of age, and the structures were separated on a cold surface. Procedures of care and use of animals were adopted according to the regulations of National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Total homogenates were prepared to AChE assays. The hippocampi were homogenized in 5 volumes of a buffered solution containing 320 mM Sacarose, 5.0 mM Hepes and 0.1 mM EDTA. Slices of hippocampi were performed to nucleotidase assays. The slices were performed transversely with 400 μ m of thickness by a McIllwain chopper tissue and maintained in a buffer containing 115 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 2.0 mM CaCl₂ and 10 mM glucose and gasified with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂.

Enzyme Assays

Nucleotidase activities were measured following Bruno et al. (2002)[8]. Briefly, two slices of hippocampus were preincubated for 10 minutes at 37°C with 500 μ l of saline-bicarbonate buffer (described above). The incubation was started by addition of

nucleotide at 2.0 mM (ATP, ADP or AMP). A sample (100µl) from incubation was mixed to 10% trichloroacetic acid in a proportion 1:1, in order to stop the reaction. The inorganic phosphate released was measured at 630 nm according to Chan et al. (1986) [11].

AChE activity was measured by method of Ellman et al. (1961) [17]. Briefly, the homogenate of hippocampus at protein concentration of 0.6 to 0.8 mg/ml was incubated in a final concentration of 5 to 10 µg in a solution constituted by DTNB and potassium phosphate buffer (100 mM pH 7.5) at the proportion of 1:4, respectively. The preincubation time was 2 minutes at 25°C and the enzyme reaction was initiated by addition of 8.0 mM acetylthiocholine. The absorbance was measured at 412 nm four times with 30 seconds of interval.

The protein concentration of both enzymatic assays was measured using serum bovine albumin as standard by Commassie blue method [6].

Statistical Analysis

The results were analyzed by two-way ANOVA considering treatment and age as factors. For comparison of caffeine or water intake for dams in all groups one-way ANOVA was used. Main effects were further analyzed by multiple comparisons of means. Statistical significance was attributed at $p < 0.05$. All data are presented as mean \pm SD.

3. Results

Caffeine treatment of dams promoted distinct alterations in activities of both nucleotidases and acetylcholinesterase activities from hippocampus preparations of neonates at 7, 14 and 21 days of age. Time and treatment factors exhibit a significant interaction to nucleotidases and acetylcholinesterase activities [F (2; 24)=10.65 for ATP

hydrolysis; $F(2;12)=11.81$ for AMP hydrolysis; $F(2;24)=15.16$ for acetylcholine degradation, $P<0,05$].

Nucleotide hydrolysis data are represented in Fig. 1. ATP hydrolysis in caffeine-treated group at 7 and 14 days of age were significantly decreased (19% and 57%, respectively) when compared to control group [$F(1; 24)=15.74$, $P<0,05$] (Fig. 1A). In contrast, the caffeine-treated group presented an increase of AMP hydrolysis (75% and 32%, respectively) in relation to the control group at 7 and 14 days of age [$F(1; 12)=22.73$, $P<0,05$] (Fig. 1C). ADP hydrolysis was not modified by caffeine treatment at all ages tested [$F(1; 18)=0.15$] (Fig. 1B).

Nucleotides hydrolysis was also modified in accordance to development [$F(2; 24)=46.74$ for ATP, $F(2; 18)=8,76$ for ADP; $F(2; 12)=11.81$ for AMP, $P<0,05$]. In the control group, only ATP hydrolysis was decreased (37%) at 14 days of age when compared to 7 days of age (Fig. 1A). In the caffeine-treated group, at 14 days of age, ATP (65%), ADP (39%) and AMP (57%) hydrolysis were diminished when compared to 7 days of age (Fig. 1). At 21 days of age, the control group presented a significant reduction in ATP (66%) and ADP (37%) hydrolysis in relation to 7 days of age, but AMP hydrolysis was unaltered (Fig.2). However, caffeine-treated group demonstrated a decrease in ATP (36%), ADP (51%) and AMP (51%) hydrolysis when compared to 7 days of age.

Caffeine treatment in animals at 7 and 14 days of age did not modify acetylcholine degradation (Fig. 2). The caffeine-treated group, at 21 days of age, presented an increase of acetylcholine degradation when compared to control (42%) [$F(1; 24)=10.31$, $P<0,05$] (Fig. 2).

There were age dependent changes in AChE activity in all groups, with significant increases in AChE activity in control and caffeine-treated groups (31% and

41%, respectively) at 14 compared to 7 days of age in the respective treatment [F(2; 24)= 78.42, P<0,05] (Fig. 2). Furthermore, at 21 days of age, control and caffeine-treated, groups showed an age-dependent increase on AChE activity (53% and 137%, respectively) when compared at 7 days of age (Fig. 2). The intake volume in all groups was not significantly different (p=0.91).

4. Discussion

In this study, maternal caffeine intake altered nucleotidase and AChE activities from hippocampus of neonate rats in a time- and treatment- dependent manner. Chronic blockade of adenosine receptors during gestational and lactational time has been demonstrated to promote alterations in adenosine receptor expression and locomotor activity in several studies [3; 15; 23]. The alteration of nucleotides and acetylcholine degradation promoted by maternal caffeine intake on immature brain can affect neurotransmission and promote modifications that remain up to adult life.

Effects of psychoactive drugs have been studied in a large number of neurotransmitter systems, including cholinergic and purinergic systems. Barcellos et al. (1998) [4] have demonstrated that tricyclic antidepressants (imipramine, desipramine and amitriptyline) were able to inhibit ATP and ADP hydrolysis from cortical synaptosomes of adult rats, suggesting that the cascade of nucleotide hydrolysis could be involved in the action of these drugs. Our results demonstrated that ATP and AMP hydrolysis are oppositely affected by chronic caffeine treatment, suggesting that the caffeine concentration that achieves the immature brain during the period test is able to alter the nucleotide hydrolysis. We verified, in previous experiments, that chronic caffeine treatment (1g/l for 14 days) was not able to affect nucleotide hydrolysis in synaptosomes of hippocampus and striatum of adult rats, reinforcing the differences of

susceptibility to caffeine actions between mature and immature brain [14]. Chronic caffeine treatment can promote a wide spectrum of alterations involving other neurotransmitter systems. It has been demonstrated that chronic caffeine treatment (1g/L for 14 days) is able to enhance acetylcholine, dopamine and glutamate release in adult rat brain, which is modulated by adenosine [2; 25; 28].

Nucleotide hydrolysis in all tested groups (except for AMP hydrolysis in the control group) declined during rat development, which may be related to the opposite increase of AChE activity also observed in all groups. Bruno et al. (2002) [8] presented the characterization of nucleotide hydrolysis (ATP and ADP) in hippocampal slices of rats at 7, 14, 20-23 and 60 days of age. In that study, a similar profile was observed on nucleotide hydrolysis during the first 21 days of neonatal development.

In our study chronic caffeine treatment during gestational and lactational time was able to affect the acetylcholinesterase activity only at rats 21 days old. Cermak et al. (1999) [10] verified that the spatial and temporal memory were enhanced in adult rats after supplementation of choline during the gestational time, indicating the persistent plasticity of cholinergic system in response to embryonic intervention. The increase of AChE activity over the early 21 days of life tested in intervals of 7 days was evident in control and caffeine groups, which is in accordance to Abdel-Latif et al. (1970) [1] and Mortensen et al. (1998) [24].

Different responses of nucleotidases and AChE to drug treatments has been reported. Barcellos et al. (1998) [4] demonstrated that tricyclic antidepressants, such as imipramine and diazepam, inhibit acetylcholinesterase and nucleotidase activities, but desipramine and amitriptyline just affected nucleotidase activity [4]. In our study, the effects observed by chronic maternal caffeine intake on nucleotides and acetylcholine

activity followed a distinct pattern, suggesting their independent modulation despite their close interaction.

In summary, maternal caffeine intake promotes alterations on AChE activity in an age and treatment-dependent manner. Caffeine affected the purinergic and cholinergic neurotransmitter systems in different ways. Such alterations in the immature brain could promote alterations in adult life, which must be further evaluated.

Acknowledgments

This study was supported by FAPERGS and CNPq.

References

1. A. A. Abdel-Latif, J. P. Smith, E. P. Ellington, Subcellular distribution of sodium-potassium adenosine triphosphatase, acetylcholine and acetylcholinesterase in developing rat brain. *Brain. Res.* 18 (1970) 441-450.
2. E. Acquas, G. Tanda, G. Di Chiara, Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naïve and caffeine-pretreated rats. *Neuropsychopharm.* 27 (2002) 182 – 193.
3. U. Adén, E. Herlenius, L-Q. Tang, B. B. Fredholm, Maternal caffeine intake has minor effects on adenosine receptor ontogeny in the rat brain. *Pediatr. Res.* 48 (2) (2000) 177-183.
4. C. K. Barcellos, M. R. Schetinger, R. D. Dias, J. J. Sarkis, In vitro effect of central nervous system active drugs on the ATPase-ADPase activity and acetylcholinesterase activity from cerebral cortex of adult rats. *Gen. Pharmacol.* 31 (4) (1998) 563-7.
5. V. Bianchi, J. Spsychala, Mammalian 5'-nucleotidases. *J. Biol. Chem.* 278 (47) (2003) 46195-46198.
6. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 218-254.
7. S. J. Brown, S. James, M. Reddington, P. J. Richardson, Both A₁ and A_{2A} purine receptors regulate striatal acetylcholine release. *J. Neurochem.* 55 (1990) 31-38.
8. A. N. Bruno, G. P. Diniz, F. K. Ricachenevsky, D. Pochmann, C. D. Bonan, M. L. Barreto-Chaves, J. J. Sarkis, Hypo-and hyperthyroidism affect the ATP, ADP and

- AMP hydrolysis in rat hippocampal and cortical slices. *Neurosci. Res.* 52 (1) (2005) 61-8.
9. G. Burnstock, Purinergic cotransmission. *Brain Res. Bull.* 50 (5/6) (1999) 355-357.
 10. J. M. Cermak, J. K. Blusztajn, W. H. Meck, C. L. Williams, C. M. Fitzgerald, D. L. Rosene, R. Loy. Prenatal availability of choline alters the development of acetylcholinesterase in the rat hippocampus. *Dev Neurosci.* 21(2) (1999) 94-104.
 11. K. Chan, D. Delfert, K. D. Jungner. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375–380.
 12. Cunha R A: Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38 (2001) (2) 107-25.
 13. R. A. Cunha, Neuroprotection by adenosine in the brain: From A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockage. *Purinergic Signalling* 1(2005) 111-134.
 14. R. S. Da Silva, A. N. Bruno, A. M. O. Battastini, J. J. F. Sarkis, D. R. Lara, C. D. Bonan, Acute Caffeine Treatment Increases Extracellular Nucleotide Hydrolysis from Rat Striatal and Hippocampal Synaptosomes. *Neurochem. Res.* 28 (8) (2003) 1273–1278.
 15. R. S. Da Silva, A. Hoffman, D. O. De Souza, D. R. Lara, C. D. Bonan, Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats. *Eur. J. Pharmacol.* 509 (2-3) (2005): 155-159.
 16. T. V. Dunwiddie, S. A. Masino, The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24 (2001) 31-55.
 17. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Anders Jr, R. M. Fearherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88-95.

18. B. B. Fedholm, K. Battig, J. Holmen, A. Nehlig, E. E. Zvartau, Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51 (1999) 83-133.
19. A. K. Gubitz, L. Widdowson, M. Kurokawa, K. A. Kirkpatrick, P. J. Richardson, Dual signaling by adenosine A_{2A} receptor involves activation of both N - and P - type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. *J Neurochem.* 67 (1996) 374-381.
20. R. Guillet, C. Kellog, Neonatal exposure to therapeutic caffeine alters the ontogeny of adenosine A₁ receptors in brain of rats. *Neuropharmacol.* 30 (5) (1991) 489-496.
21. B. Johansson, V. Georgiev, K. Lindström, B. B. Fredholm, A₁ and A_{2A} adenosine receptors and A₁ mRNA in mouse brain: effect of long-term caffeine treatment. *Brain Res.* 762 (1997) 153-164.
22. I. P. Kirk, P. J. Richardson, Adenosine A_{2A} receptor-mediated modulation of striatal [3H] GABA and [3H] Ach release. *J. Neurochem.* 62 (1994) 960-966.
23. D. León, J. L. Albasanz, M. A. Ruíz, M. Fernández, M. Martín, Adenosine A₁ receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J. Neurochem.* 82 (2002) 625-634.
24. S. R. Mortensen, M. J. Hooper, S. Padilla, Rat brain acetylcholinesterase activity: developmental profile and maturational sensitivity to carbamate and organophosphorus inhibitors. *Toxicol.* 125 (1998) 13-19.
25. Quarta D, Ferre S, Solinas M, You Z B, Hockemeyer J, Popoli P, Goldberg S R: Opposite modulatory roles for adenosine A₁ and A_{2A} receptors on glutamate and dopamine release in the shell of the nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. *J. Neurochem.* 88 (5) (2004) 1151-8.

26. V. Ralevic, G. Burnstock, Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50 (3) (1998) 413-492.
27. S. A. Rivkees, Z. Zhao, G. Porter, C. P. Turner, Influences of adenosine on the fetus and newborn. *Mol. Genet. Metab.* 74 (2001) 160-171.
28. M. Solinas, S. Ferré, S. Z. B. You, M. Karcz-Kubicha, P. Popoli, S. R. Goldberg, Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 22 (15) (2002) 6321-6324.
29. C. P. Turner, H. Yan, M. Schwartz, T. Othman, S. A. Rivkees, A₁ adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss. *NeuroReport* 13 (2002) 1199-1204.
30. D. R. Weaver, A₁ – adenosine receptor gene expression in fetal rat brain. *Dev. Brain Res.* 94 (1996) 205-223.
31. H. Zimmermann, Ecto-nucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52 (2001) 44-56.

LEGEND TO FIGURES

Fig. 1: Effects of caffeine maternal intake on hippocampal nucleotidase activity of 7, 14 and 21 days old neonate rats. Bars represent mean \pm standard deviation. (A): ATP hydrolysis (n=3). (B): ADP hydrolysis (n=4). (C): AMP hydrolysis (n=5). * Represents significant difference when compared to control at the same age, # represents significant difference when compared to 7 days at same treatment. Two-way ANOVA was used considering treatment and age as factors. Main effects were further analyzed by multiple comparisons of means. $p < 0.05$ were considered a significant difference.

Fig. 2: Effects of caffeine maternal intake on hippocampal AChE activity of 7, 14 and 21 days old neonate rats. Bars represent mean \pm standard deviation (n=5). * Represents significant difference when compared to control at the same age, # represents significant difference when compared to 7 days of age at same treatment. Two-way ANOVA was used considering treatment and age as factors. Main effects were further analyzed by multiple comparisons of means. $p < 0.05$ were considered a significant difference.

Fig. 1

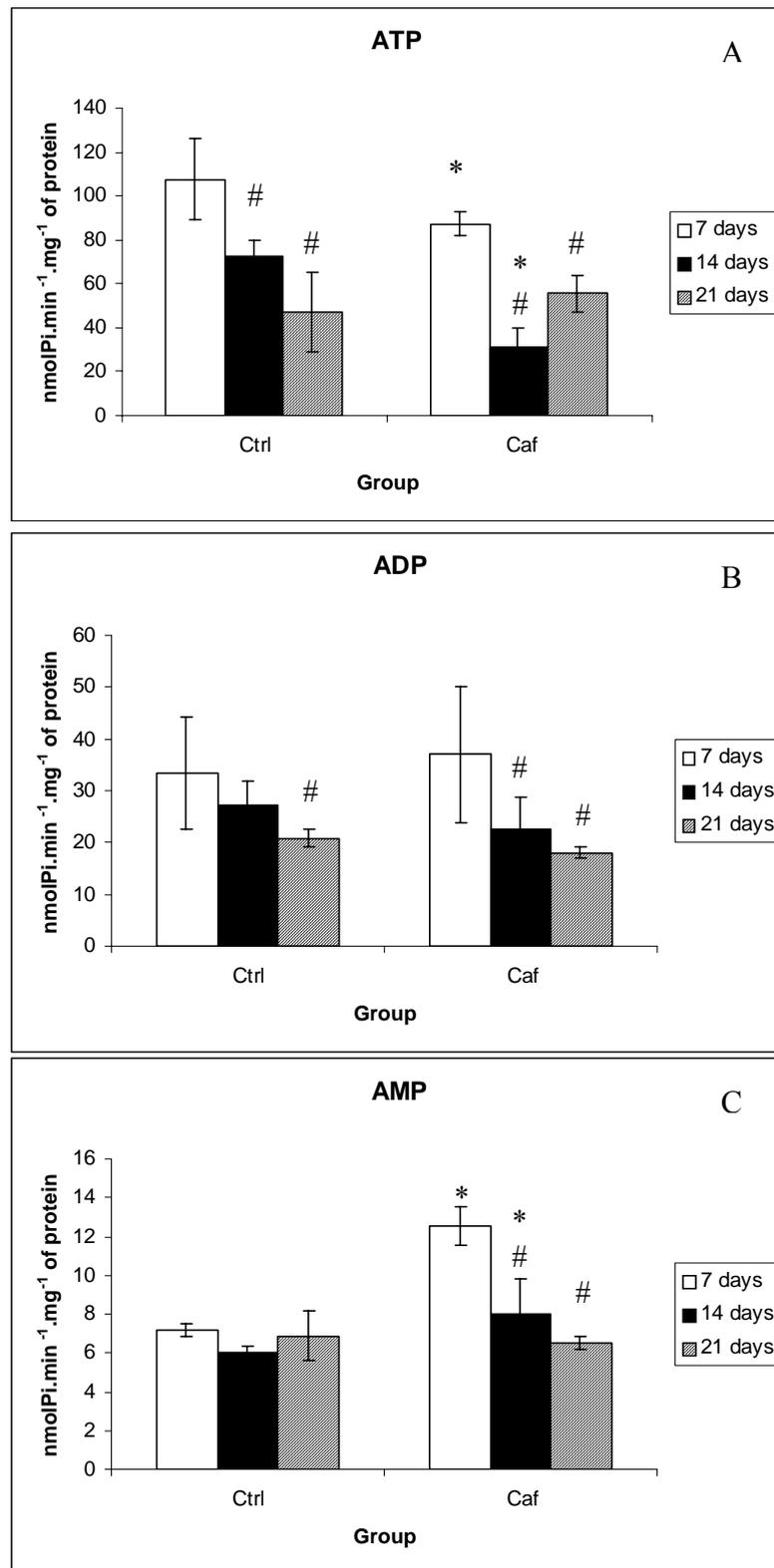
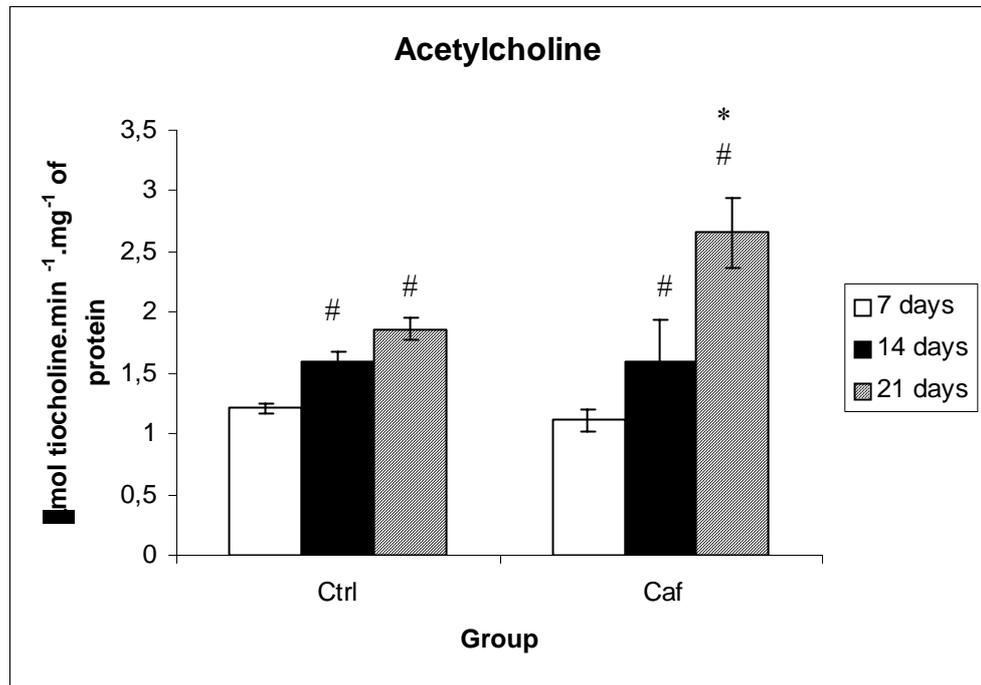


Fig. 2



III DISCUSSÃO

Durante a fase de desenvolvimento neural existe um intenso conjunto de transformações nas células da neuroectoderme, as quais darão origem aos diversos tipos celulares do sistema nervoso, tais como os neurônios, as células da glia, as células ependimais, as células do plexo coróide e as células de Schwann.

Em seres humanos esta fase de diferenciação, migração, proliferação e crescimento das células do sistema nervoso tem seu término, aproximadamente, ao fim do segundo mês gestacional (Siegel et al., 1993). Ratos exibem entre os 9 e 12 dias de vida fetal um desenvolvimento cerebral próximo a um humano recém-nascido, e ao fim da gestação um padrão de desenvolvimento neural semelhante a um neonato humano de seis meses (Benesová et al., 2001).

Alterações durante a fase gestacional e neonatal podem influenciar significativamente o efeito de drogas através de modificações no padrão de absorção, distribuição, formas ativas e excreção do composto (Christian e Brent, 2001). Efeitos no comportamento adulto também podem ser vistos após intervenção durante o desenvolvimento neural, tais como o observado por Lipska e colaboradores (2002). Nesta investigação, a administração de TTX (tetrodotoxina) na porção ventral do hipocampo de ratos aos sete dias de vida promoveu hiperatividade em resposta à novidade e a injeções de salina, anfetamina (1,5 mg/kg) e MK-801 (0,2 mg/kg) na fase adulta. Estes dados sugeriram que uma perda transitória da atividade hipocampal durante a fase de maturação neuronal promove modificações permanentes nos circuitos neurais, que mediam comportamentos relacionados aos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico.

A presença de receptores adenosinérgicos funcionais desde fases iniciais do desenvolvimento neural sugerem que a ação da adenosina possa ser relevante para o desenvolvimento neural normal. Algumas investigações têm apontado que intervenções no sistema adenosinérgico durante fases iniciais do desenvolvimento, principalmente relativas a maturação do sistema nervoso central, são prejudiciais considerando o importante efeito modulador da adenosina (Adén et al., 2001; Rivkees et al., 2001; Turner et al., 2002; León et al., 2005).

Desta forma, tornaram-se muito relevantes investigações acerca dos efeitos da cafeína, um antagonista dos receptores adenosinérgicos, durante as fases gestacional e neonatal, considerando as propriedades de absorção da cafeína e o grande consumo populacional. Os efeitos da administração crônica de cafeína sobre os sistemas de neurotransmissão e neuromodulação são encontrados na literatura através da análise de diversos aspectos, entre eles, a liberação de neurotransmissores, expressão de receptores, bem como parâmetros comportamentais.

Na primeira investigação apresentada nesta tese, contribuímos para o entendimento dos efeitos exercidos pela cafeína sobre a disponibilidade de adenosina, através da verificação do efeito do tratamento crônico e agudo com cafeína sobre as atividades nucleotídicas em hipocampo e estriado de ratos adultos. Foi verificado neste estudo que a administração oral crônica de cafeína (0,3 e 1,0 g/l) na água de beber durante 14 dias foi incapaz de alterar as atividades de hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP. Desta forma a importante contribuição na manutenção dos níveis de adenosina exercida pela ação destas nucleotidases parece não ser alterada pela administração crônica de cafeína, o que nos leva a sugerir que um restabelecimento do sistema adenosinérgico é alcançado em poucos dias de antagonismo dos receptores adenosinérgicos. Este restabelecimento pode estar envolvido com o aumento da

expressão dos receptores de adenosina verificado quando antagonistas são administrados. De fato, Johansson e colaboradores (1993), em um experimento semelhante (1g/l durante 12 dias), demonstraram um aumento da expressão de receptores A₁. Karcz-Kubicha e colaboradores (2003) verificaram um aumento na afinidade dos receptores A₁ no estriado de ratos submetidos a um tratamento semelhante. Além disto, Svenningsson e colaboradores (1999) verificaram um aumento de RNAm de receptores A₁ na amígdala lateral de ratos tratados cronicamente com 1g/l de cafeína durante 14 dias.

Neste mesmo estudo, ao administrarmos cafeína de forma aguda (30 mg/kg) verificamos um aumento na hidrólise de ATP (50%) e ADP (32%) em sinaptossomas de hipocampo e estriado, respectivamente. Estes dados apontam para uma resposta imediata à cafeína na cascata de enzimas que hidrolisam nucleotídeos púricos, talvez promovendo um aumento nos níveis de adenosina. A administração de cafeína intraperitoneal e intravenosa é capaz de induzir a liberação de neurotransmissores, tais como glutamato, dopamina e acetilcolina em diversas regiões cerebrais (Acquas et al., 2002; Solinas et al., 2002). A co-liberação de ATP com outros neurotransmissores como glutamato, dopamina, acetilcolina, ácido γ -aminobutírico foi estabelecida em terminais nervosos do sistema nervoso central e periférico (Burnstock, 1999). Em nossa investigação, o aumento da atividade de hidrólise de ATP e ADP após a administração aguda de cafeína pode estar relacionado com esta capacidade da cafeína de estimular a liberação de neurotransmissores e, conseqüentemente, de ATP, aumentando a disponibilidade destes nucleotídeos para a via das nucleotidasas. O possível aumento dos níveis de adenosina poderia competir e contrabalançar a ação antagônica da cafeína, presente em altos níveis após a administração aguda desta.

Sabendo da suscetibilidade do cérebro imaturo aos ligantes de receptores adenosinérgicos e da interação existente entre os sistemas adenosinérgicos e glutamatérgicos, investigamos o efeito da exposição fetal e neonatal à cafeína na atividade locomotora induzida por um antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA (MK-801) na idade de 21 dias. A locomoção basal não foi alterada pelo tratamento com cafeína, estando estes dados de acordo com o desenvolvimento de tolerância aos efeitos da cafeína (Fredholm et al., 1999; Svenningsson et al., 1999; Karcz-Kubicha et al., 2003;). Karcz-Kubicha e colaboradores (2003) sugeriram que o efeito hiperlocomotor da cafeína é devido ao simultâneo bloqueio dos receptores A_1 e A_{2A} , e que a tolerância a estes efeitos é, principalmente, um resultado do bloqueio dos receptores A_1 .

Em nosso estudo, foi verificado que a exposição por longo tempo à cafeína é capaz de alterar a resposta ao antagonismo de receptores de glutamato do tipo NMDA, pelo menos no que se refere a hiperlocomoção classicamente induzida por essa ação antagonista. A fim de verificar se a diminuição à resposta ao MK-801 era relativa à ação direta da cafeína ou a alguma alteração permanente na interação dos sistemas adenosinérgico e glutamatérgico, retiramos a cafeína uma semana antes do experimento. Este grupo abstinido de cafeína por sete dias antes do experimento apresentou locomoção diminuída em resposta ao MK-801, de forma similar ao grupo que recebeu cafeína até o dia do experimento. Estes dados sugeriram que a ação da cafeína de forma direta não é o mecanismo pelo qual os efeitos verificados em nossos experimentos poderiam ser explicados. Uma adaptação dos circuitos de modulação adenosinérgica sobre o sistema glutamatérgico durante o tratamento pode ser uma possibilidade para os efeitos verificados. De fato, uma diminuição no tônus inibitório exercido pela adenosina poderia facilitar a liberação de neurotransmissores como o glutamato.

A interação entre os receptores adenosinérgicos e glutamatérgicos é bem estabelecida e envolve controle adenosinérgico da liberação de glutamato, da ativação de receptores NMDA, bem como a liberação de adenosina, quando receptores NMDA são ativados em hipocampo e estriado de ratos (Manzoni et al., 1994; De Mendonça e Ribeiro, 1997; Delaney et al., 1998; Sebastião e Ribeiro, 2000; Ciruela et al., 2001; Solinas et al., 2002). Além disto, De Oliveira e colaboradores (2005) observaram que os efeitos do antagonismo inespecífico dos receptores de adenosina pela cafeína prejudicam os efeitos hiperlocomotores do antagonismo dos receptores de glutamato NMDA, através da administração de MK-801. Entretanto, nesta investigação os animais são camundongos adultos. Além disto, o efeito direto da cafeína não está descartado pela ausência de um grupo abstido de cafeína.

Os receptores NMDA de cérebro de ratos apresentam-se imaturos e mais sensíveis durante as duas primeiras semanas de vida (Hestrin, 1992; Sircar, 2000), o que pode estar relacionado com nossos resultados, se considerarmos os efeitos exercidos pela cafeína sobre a liberação de glutamato (Solinas et al., 2002). O aumento dos níveis de glutamato associados à sensibilidade aumentada dos receptores NMDA poderia levar a uma dessensibilização destes receptores afetando a ação do antagonismo exercido pelo MK-801.

A capacidade da cafeína em promover alterações no cérebro imaturo, as quais persistem em animais jovens, foi avaliada também com relação ao limiar de dor em ratos de 14 e 50 dias de vida, bem como a analgesia induzida pelo estresse em ratos adultos. Nesta investigação, verificamos que a presença da cafeína, através da ingestão materna, é capaz de afetar a resposta ao estímulo doloroso em ratos de 14 dias de vida. Esta analgesia observada foi abolida quando a cafeína foi retirada sete dias antes do teste, sugerindo que a ação analgésica foi exercida por ação direta da cafeína. Ratos que

receberam cafeína desde a fase gestacional até a fase adulta não exibiram efeito analgésico quando testados aos 50 dias de vida. Este resultado pode indicar um processo adaptativo associado ao restabelecimento da modulação adenosinérgica, que é relevante dada a importância da percepção do estímulo doloroso para o organismo. Entretanto, quando a resposta ao estresse agudo foi avaliada, os animais que receberam cafeína desenvolveram analgesia semelhante ao grupo controle, o que não foi observado nos animais abstidos de cafeína sete dias antes do teste. A analgesia induzida por estresse possui um forte componente opióide e a preservação da ação opióide pode estar relacionada com a indução de analgesia após estresse mesmo na presença de cafeína. Entretanto, valores menores de limiar de dor após estresse observados no grupo abstido de cafeína podem estar relacionados à promoção de ansiedade verificada em animais tratados com cafeína (File et al., 1988). Adicionalmente, Giménes-Llort e colaboradores (2002) demonstraram que animais sem a expressão de receptores adenosinérgicos A₁ são mais ansiosos.

Considerando as alterações verificadas na locomoção e no limiar de dor em animais tratados com cafeína nas fases gestacional e neonatal, aliadas aos efeitos na via das nucleotidases em animais adultos tratados com cafeína de forma crônica e aguda, foi realizado uma avaliação dos efeitos da ingestão materna de cafeína sobre as atividades nucleotídica e colinesterásica do hipocampo dos ratos filhotes aos 7, 14 e 21 dias. Em ratos de 7 e 14 dias de vida, a hidrólise de ATP foi menor nos ratos tratados com cafeína que nos ratos controle, enquanto que nestas mesmas idades a hidrólise de AMP foi aumentada no grupo tratado com cafeína em relação ao controle. A hidrólise de ADP não foi alterada pelo tratamento crônico com cafeína. O grupo controle e o grupo que recebeu tratamento crônico com cafeína exibiram uma redução tempo-dependente das atividades de hidrólise de nucleotídeos (exceto para a hidrólise do AMP no grupo

controle). O tratamento com cafeína foi capaz de promover alterações sobre a atividade colinesterásica somente nos ratos de 21 dias de vida. Um aumento da atividade colinesterásica de forma tempo-dependente foi verificado nos grupos controle e tratado com cafeína. Já foi demonstrado que o bloqueio crônico dos receptores de adenosina durante o período gestacional e neonatal exerce alterações na expressão de receptores adenosinérgicos e na atividade locomotora dos animais na fase juvenil ou adulta (Adén et al., 2000; León et al., 2002; Da Silva et al., 2005 – Capítulo II.2). As alterações encontradas nas atividades enzimáticas de degradação de nucleotídeos e acetilcolina no cérebro de ratos imaturos promovidas pela ingestão materna de cafeína podem afetar os sistemas de neurotransmissão, bem como promover alterações que permaneçam na vida adulta.

O conjunto de dados obtido nesta tese aponta o sistema adenosinérgico como uma via modulatória sensível a intervenções farmacológicas que produzem alterações, as quais podem ser permanentes. A escolha da cafeína como principal droga utilizada nos testes tem especial relevância devido ao seu consumo mundialmente elevado, bem como suas propriedades farmacocinéticas que permitem a exposição dos fetos à ingestão desta durante a gestação. A utilização da cafeína com propósitos terapêuticos é bastante documentada e a associação deste fato com a suscetibilidade neonatal é uma questão a ser explorada. Metilxantinas estão entre as drogas mais prescritas na medicina neonatal, principalmente em deficiências respiratórias como a apnéia (Millar e Schmidt, 2004). Além disto, estudos epidemiológicos apontam uma relação inversa entre consumo de cafeína e risco de desenvolver doença de Parkinson, semelhante ao verificado com a utilização de nicotina (Ross e Petrovitch, 2001; Ascherio e Chen, 2003). A neuroproteção relativa à doença de Parkinson parece ter como alvo principal o antagonismo dos receptores adenosinérgicos A_{2A} (Schwarzschild et al., 2003). A cafeína

também é utilizada como droga com potencial analgésico para inflamação e dor neuropática (Dickenson et al., 2005). O receptor adenosinérgico A_1 exerce modulação de receptores NMDA em vias nociceptivas da medula espinhal, o que parece estar envolvido com o poder modulador da dor em sítios espinhais (Reeve et al., 1998).

Em nossos estudos, verificamos que a administração de cafeína durante a fase neonatal promoveu, na maioria dos parâmetros testados, um restabelecimento das condições normais de modulação adenosinérgica. Este fato pode ser exemplificado: (1) pelo desempenho de locomoção inalterado visto nos animais de 21 dias de vida tratados e abstidos de cafeína, considerando a locomoção basal destes animais; e (2) pelo restabelecimento dos padrões de limiar de dor em animais jovens e adultos, bem como na indução de analgesia após estresse. Isto se torna importante visto que estes dois fatores são importantes para o desenvolvimento e sobrevivência do organismo. Entretanto, a indução de hiperlocomoção pela administração de MK-801 foi alterada de forma significativa pela exposição à cafeína. Esta alteração não corresponde a uma situação normal ou basal para o organismo, o que pode identificar uma modificação em condições onde há uma alteração no tônus exercido pela adenosina.

Os receptores adenosinérgicos de alta afinidade, A_1 e A_{2A} , são ativados pela adenosina nas concentrações fisiológicas, proporcionando a manutenção do tônus adenosinérgico (Sebastião e Ribeiro, 2000). As adaptações que provavelmente foram desenvolvidas durante os tratamentos com cafeína realizados nesta tese foram encontrados em situações basais, tais como a locomoção espontânea e o limiar de dor. As alterações encontradas em animais que receberam cafeína estão relacionadas a estímulos provocados, tais como a hiperlocomoção induzida por MK-801 e a indução de estresse, situações nas quais a concentração de adenosina pode estar alterada.

A ação direta da cafeína foi capaz de alterar a nocicepção em ratos de 14 dias expostos a cafeína durante a gestação e a lactação, o que foi confirmado pelo retorno aos valores basais de limiar de dor quando a cafeína foi retirada. Em ratos neonatos que receberam cafeína até os 21 dias de vida, também foi possível verificar alteração na degradação de acetilcolina. Além disto, a administração aguda em ratos adultos foi capaz de alterar a hidrólise de nucleotídeos em sinaptossoma de hipocampo e de estriado. Isto pode sugerir que a cafeína, quando ainda presente no organismo testado, pode exercer efeitos diretos, pelo menos nos parâmetros citados (Fredholm et al., 1999; Aqcuas et al., 2002).

Os efeitos da cafeína têm sido intensamente investigados e existe uma certa dificuldade em determiná-los, visto que são suscetíveis ao tratamento realizado, doses testadas, gênero do organismo testado, bem como fase do desenvolvimento em que se encontram. As investigações aqui apresentadas contribuem ao entendimento dos efeitos das intervenções neonatais em parâmetros locomotores, de dor e de vias enzimáticas na vida jovem e adulta.

Investigações futuras deverão ser realizadas com o intuito de adicionar informações ao entendimento da exposição neonatal a drogas que interferem no sistema adenosinérgico. Estas investigações poderão envolver a análise da expressão de receptores de adenosina, da expressão das enzimas envolvidas na produção de adenosina e seus efeitos sobre outros sistemas de neurotransmissão. Parâmetros comportamentais, tais como comportamento social, ansiedade e agressividade também são importantes aspectos a serem investigados para compor um quadro mais completo dos efeitos da cafeína durante a fase de desenvolvimento neural.

IV CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados nesta tese nos permitem observar que a intervenção no sistema adenosinérgico, através da administração de cafeína durante as fases gestacional e neonatal, é capaz de promover adaptações fisiológicas na tentativa de restabelecer o controle modulador adenosinérgico. Estas adaptações podem ser observadas pelo restabelecimento da resposta nociceptiva e locomotora, bem como na regulação dos níveis extracelulares dos neurotransmissores ATP e acetilcolina e do neuromodulador adenosina. Portanto, nossos resultados permitem apresentar as seguintes conclusões:

- (1) A administração aguda de cafeína na concentração de 15mg/Kg em ratos adultos foi capaz de modificar a hidrólise de ATP e ADP em sinaptossoma de hipocampo e estriado de ratos adultos, respectivamente. A administração crônica de cafeína na água de beber nas concentrações de 0,3 e 1,0g/l, também em ratos adultos, não foi capaz de alterar estas atividades de degradação de nucleotídeos. A degradação de AMP não foi alterada em nenhuma das situações.
- (2) A administração de cafeína na concentração de 1g/l na água de beber de ratas mães não foi capaz de alterar a atividade locomotora espontânea dos ratos filhotes aos 21 dias de vida. Em ratos em que a cafeína foi retirada quatorze dias antes do teste, a atividade locomotora permaneceu semelhante ao grupo controle. A indução de hiperlocomoção pela administração de MK-801 foi

prejudicada em animais que receberam cafeína e naqueles que foram abstinidos de cafeína por sete dias antes do teste, em relação ao controle.

- (3) Ratos de 14 dias, os quais receberam leite materno de ratas tratadas cronicamente com cafeína (1g/l), exibiram limiar de dor elevado em relação aos animais controle. Esta ação analgésica do tratamento crônico com cafeína foi abolida quando o tratamento foi suspenso sete dias antes do teste. Filhotes que foram desmamados aos 21 dias, e continuaram recebendo o mesmo tratamento que as ratas mães até os 50 dias de vida, não exibiram diferenças no limiar de dor em relação aos controles, mesmo naqueles animais em que a cafeína foi substituída por água sete dias antes do teste. A avaliação da analgesia induzida por estresse foi avaliada no grupo de animais aos 50 dias de vida e foi verificado que a presença de cafeína não altera analgesia após indução de estresse. Ratos abstinidos de cafeína por sete dias antes dos experimentos exibiram uma leve, porém significativa, diminuição no limiar de dor após indução de estresse.
- (4) O tratamento crônico com cafeína (1g/l) na água de beber de ratas mães não alterou a elevação desenvolvimento-dependente da atividade colinesterásica em hipocampo de ratos filhotes. A análise dos dois grupos testados (controle, cafeinado) nas idades de 7, 14 e 21 dias demonstrou que o tratamento com cafeína foi capaz de aumentar a degradação de acetilcolina aos 21 dias de vida neonatal. A degradação de nucleotídeos em fatias de hipocampo de ratos controle e que receberam cafeína (1g/l) mostrou-se significativamente diferente. A hidrólise de ATP foi diminuída em ratos de 21 dias de vida e a hidrólise de AMP foi aumentada nas idades de 7 e 14 dias de vida, em

relação ao controle. A hidrólise de ADP não foi alterada pelo tratamento com cafeína em nenhuma das idades testadas.

Este conjunto de conclusões nos permite verificar que a administração crônica de cafeína promove alterações diferenciadas de acordo com a idade em que se administra o tratamento e na qual é feita a avaliação do animal. Isto pode ser demonstrado quando foi avaliada as atividades de hidrólise de nucleotídeos. Em sinaptossomas de animais adultos que receberam tratamento crônico com cafeína, estas atividades permaneceram inalteradas e, em animais que receberam tratamento crônico com cafeína na fase gestacional e neonatal e foram avaliados até a terceira semana de vida, estas atividades enzimáticas em fatias cerebrais estavam alteradas. Adicionalmente, quando o limiar de dor foi avaliado em animais jovens e adultos pode-se notar que animais jovens sob tratamento com cafeína apresentavam analgesia, mas quando o tratamento era suspenso, o limiar de dor retornava ao normal. Isto não foi observado em animais adultos que sofreram o mesmo tratamento, visto que independente da presença do tratamento com cafeína, o limiar de dor foi similar aos ratos controle adultos.

Na avaliação da locomoção, fica evidente que uma adaptação no sistema adenosinérgico ocorreu, o que alterou a resposta do sistema glutamatérgico frente a um clássico antagonista de receptores NMDA (MK-801). Além disto, esta alteração é permanente por no mínimo quatorze dias, visto que a retirada do tratamento crônico com cafeína não restabeleceu a resposta a este antagonista.

Desta forma, os efeitos do tratamento crônico com cafeína promove alterações diferenciadas de acordo com o tratamento, a idade e o parâmetro avaliado. Os efeitos da cafeína verificados aqui nesta tese reafirmam a questão sobre a importância, a

suscetibilidade e a plasticidade da neuromodulação adenosinérgica durante a fases iniciais de desenvolvimento neural e suas conseqüências no indivíduo maduro.

V REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abo-Salem, O M, Hayallah, A M, Bilkei-Gorzo, A, Filipek, B, Zimmer, A, Muller, C E. Antinociceptive effects of novel A2B adenosine receptor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; 308 (1):358-66.
- Acquas, E, Tanda, G, Di Chiara, G. Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naïve and caffeine-pretreated rats. *Neuropsychopharm.* 2002; 27: 182 – 193.
- Adén, U, Herlenius, E, Tang, L-Q, Fredholm, B B. Maternal caffeine intake has minor effects on adenosine receptor ontogeny in the rat brain. *Pediatr. Res.* 2000; 48 (2): 177-183.
- Adén, U, Leverin, A L, Hagberg, H, Fredholm, B B. Adenosine A(1) receptor agonism in the immature rat brain and heart. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 426 (3): 185-192.
- Aley, K O, Green, P G, Levine, J D. Opioid and adenosine peripheral antinociception are subject to tolerance and withdrawal. *J Neurosci.* 1995; 15 (12): 8031-8038.
- Aley, K O, Levine, J D. Multiple receptors involved in peripheral α_2 , μ , and A₁ antinociception, tolerance and withdrawal. *J. Neurosci.* 1997a; 17 (2): 735-744.
- Aley, K O, Levine, J D. Different mechanisms mediate development and expression of tolerance and dependence for peripheral mu-opioid antinociception in rat. *J Neurosci.* 1997b; 17 (20): 8018-8023.
- Ascherio, A, Chen, H. Caffeinated clues from epidemiology of Parkinson's disease. *Neurology.* 2003; 61 (11): S51-54.
- Aumeerally, N, Allen, G, Sawynok, J. Glutamate-evoked release of adenosine and regulation of peripheral nociception. *Neuroscience.* 2004; 127 (1): 1-11.

- Battastini, A M, da Rocha, J B, Barcellos, C K, Dias, R D, Sarkis, J J.
Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 1991; 16 (12): 1303-1310.
- Benesová, O, Tejkalová, H, Křištofiková, Z, Hušek, P, Nevídikova, J, Yamamotova, A.
Brain neurodevelopment and neurobehavioural deviations in adult rats treated neonatally with indometracin. *Eur. Neuropsychopharm.* 2001; 11: 367-373.
- Bianchi, V, Spychala, J. Mammalian 5'-nucleotidases. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (47): 46195-46198.
- Biber, K, Klotz, K N, Berger, M, Gebicke-Harter, P J, Van Calker, D. Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J. Neurosci.* 1997; 17 (13): 4956-4964.
- Biederbick, A, Kosan, C, Kanz, J, Elsasser, H P. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 19018-19024.
- Bigonnesse, F, Lévesque, S A, Kukulski, F, Lecka, J, Robson, S C, Fernandes, M J, Sevigny, J. Cloning and characterization of mouse nucleotide triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 2004; 43: 5511-5519.
- Blustein, J E, Hornig, G, Bostwick-Poli, M. Role of contextual stimuli in tolerance to stress-induced analgesia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995; 52 (4): 841-844.
- Brambilla, R, Cottini, L, Fumagalli, M, Ceruti, S, Abbracchio, M P. Blockade of A2A adenosine receptors prevents basic fibroblast growth factor induced reactive astrogliosis in rat striatal primary astrocytes. *Glia.* 2003; 43 (2): 190-194.
- Braun, N, Fengler, S, Ebeling, C, Servos, J, Zimmermann, H. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase 6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem. J.* 2000a; 351 (3): 369-347.

- Braun, N, Sevigny, J, Robson, S C, Enjyoji, K, Guckelberger, O, Hammer, K, Di Virgilio, F, Zimmermann H. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur. J. Neurosci.* 2000b; 12 (12): 4357-4366.
- Brundege, J M, Dunwiddie, T V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol.* 1997; 39: 353-391.
- Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 1972; 24: 509-581.
- Burnstock, G. Purinergic cotransmission. *Brain Res. Bull.* 1999; 50 (5/6): 355-357.
- Burnstock, G. P2X receptors in sensory neurones. *Br. J. Anaesth.* 2000; 84 (4): 476-488.
- Burnstock, G. Introduction: P2 Receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 2004; 4: 793-803.
- Burnstock, G, Wood, J N. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1996; 6: 526-532.
- Cahill, C M, White, T D, Sawynok, J. Morphine activates omega-conotoxin-sensitive Ca²⁺ channels to release adenosine from spinal cord synaptosomes. *J. Neurochem.* 1993; 60 (3): 894-901.
- Cahill, C M, White, T D, Sawynok, J. Spinal opioid receptors and adenosine release: neurochemical and behavioral characterization of opioid subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 275 (1): 84-93.
- Cahill, C M, White, T D, Sawynok, J. Substance P releases and augments the morphine-evoked release of adenosine from spinal cord. *Brain Res.* 1997; 760 (1-2): 294-7.
- Cartmell, J, Kemp, J A, Alexander, S P, Shinozaki, H, Kendall, D A. Modulation of cyclic AMP formation by putative metabotropic receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* 1994; 111 (1): 364-369.

- Cassada, D C, Tribble, C G, Long, S M, Kaza, A K, Linden, J, Rieger, J M, Rocín, D, Kron, I L, Kern, J A. Adenosine A_{2A} agonist reduces paralysis after spinal cord ischemia correlation with A_{2A} receptor expression on motor neurons. *Ann. Thorac. Surger.* 2002; 74: 846-850.
- Cook, C D, Beardsley, P M. The modulatory actions of dopamine D_{2/3} agonist and antagonistS on the locomotor-activating effects of morphine and caffeine in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003; 75: 363-371.
- Correia-de-Sá, P, Ribeiro, J A. Evidence that the presynaptic A_{2A}-adenosine receptor of the rat motor nerve endings is positively coupled to adenylate cyclase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1994; 350 (5): 514-522.
- Christian, M S, Brent, R L. Teratogen update: evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine. *Teratology.* 2001; 64 (1): 51-78.
- Ciruela, F, Escriche, M, Soloviev, M M, Canela, E I, Burgeño, J, Mallol, J, Chan, W, Lluis, C, McIlhinney, R A J, Franco, R. Adenosine-glutamate receptor-receptor interactions in the central nervous system. *Drug Dev. Res.* 2001; 52: 316-322.
- Costenla, A R, Lopes, L V, De Mendonça, A, Ribeiro, J A. A functional role for adenosine A₃ receptors: modulation of synaptic plasticity in the rat hippocampus. *Neurosc. Letters.* 2001; 302: 53-57.
- Cunha, R A, Milusheva E, Vizi E S, Ribeiro J A, Sebastião A M. 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.* 1994; 63 (1): 207-214.
- Cunha, R A, Correia-de-Sá, P, Sebastião, A M, Ribeiro, J A. Preferential activation of excitatory adenosine receptors at hippocampal and neuromuscular synapses by

- adenosine formed from released adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 119 (2): 253-260.
- Cunha, R A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 2001a; 38 (2): 107-25.
- Cunha, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A_{2A} receptor blockage. *Purinergic Signall.* 2005; 1: 111-134.
- Cunha, R A, Ribeiro, J A. ATP as a presynaptic modulator. *Life Sciences.* 2000; 68:119-137.
- Da Silva, R S, Hoffman, A, De Souza, D O, Lara, D R, Bonan, C D. Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats. *Eur J Pharmacol.* 2005; 509 (2-3): 155-159.
- De Oliveira, R V, Dall'Igna, O P, Tort, A B L, Schuh, J F, Neto, P F, Gomes, M W Santos, Souza, D O, Lara, D R. Effect of subchronic caffeine treatment on MK-801-induced changes in locomotion, cognition and ataxia in mice. *Behav. Pharmacol.* 2005; 16 (2): 79-84.
- Delaney, S M, Shepel, P N, Geiger, J D. Levels of endogenous adenosine in rat striatum. I. Regulation by ionotropic glutamate receptors, nitric oxide and free radicals. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 1998; 285 (2): 561-567.
- DeLanders, G E, Hopkins, C J. Spinal adenosine modulates descending antinociceptive pathways stimulated by morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986; 239: 88-93.
- De Mendonça, A, Ribeiro, J A. Influence of metabotropic glutamate receptor agonists on the inhibitory effects of adenosine A1 receptor activation in the rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 121 (8): 1541-8.

- Dhalla AK, Dodam JR, Jones AW, Rubin LJ. Characterization of an NBTI-sensitive equilibrative nucleoside transporter in vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33(6):1143-52.
- Dickenson A H, Suzuki R. Opioids in neuropathic pain: clues from animal studies. *Eur J Pain.* 2005; 9(2): 113-116.
- Dixon, A K; Gubitza, A K; Sirinathsinghji, D J; Richardson, P J.; Freeman, T C. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol.* 1996; 118 (6): 1461-8.
- Dolphin, A C, Forda, S R, Scott, R H. Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue. *J. Physiol.* 1986; 373: 47-61.
- Domenici, M. R., Peponi, R., Martire, A., Tebano, M. T., Potenza R. L., Popoli, P. Permissive role of adenosine A_{2A} receptors on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR₅)- mediated effects in the striatum. *J. Neurochem.* 2004; 90 (5): 1276-1279.
- Dunwiddie, T V, Masino, S A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001; 24: 31-55.
- Esser, M J, Sawynok, J. Caffeine blockade of the thermal antihyperalgesic effect of acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacology.* 2000; 399 (2-3): 131-139.
- Ferré, S, Fuxe K, von Euler, G, Johansson, B, Fredholm, B B. Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience.* 1992; 51: 501-512.
- Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1997; 20 (10): 482-487.

- Ferre S, Popoli P, Gimenez-Llort L, Finnman UB, Martinez E, Scotti de Carolis A, Fuxe K. Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A1 and dopamine D1 receptors. *Neuroreport*. 1994; 6 (1): 73-76.
- Ferre, S, Popoli, P, Giménez-Llort, L, Rimondini, R, Müller, C E, Strömberg, I, Ögren, S V, Fuxe, K. Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*. 2001; 7: 235-241.
- Ferre, S, von Euler, G, Johansson, B, Fredholm, B B, Fuxe, K Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88 (16): 7238-7241.
- File, S E, Baldwin, H A, Johnston, A L, Wilks, L J. Behavioral effects of acute and chronic administration of caffeine in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1988; 30 (4): 809-815.
- Fredholm, B B, Altiok, N. Adenosine A2B receptor signalling is altered by stimulation of bradykinin or interleukin receptors in astroglia cells. *Neurochem. Int*. 1994; 25 (1): 99-102.
- Fredholm, B B, Battig, K, Holmen, J, Nehlig, A, Zvartau, E E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev*. 1999; 51: 83-133.
- Fredholm, B B, Ijzerman, A P, Jacobson, K A, Klotz, K N, Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev*. 2001; 53: 527-552.
- Fredholm, B B, Svenningsson, P. Adenosine-dopamine interactions: Development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. *Neurology*. 2003; 61(6): S5-S9.

- Freissmuth, M, Schutz, W, Linder, M E. Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. Selectively for rGi alpha-3. *J. Biol. Chem.* 1991a; 266 (27): 17778-17783.
- Freissmuth, M, Selzer, E, Schutz, W. Interactions of purified bovine brain A1-adenosine receptors with G-proteins. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding. *Biochem. J.* 1991b; 275 (3): 651-656.
- Fuxe, K., Ferre, S., Zoli, M., Agnati, LF. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intermembrane adenosine A2A/dopamine D₂ e adenosine A₁/dopamine D₁ receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res. Rev.* 1998; 26: 258-73.
- Gebicke-Haerter, P J, Christoffel, F, Timmer, J, Northoff, H, Berger, M, Van Calker, D. Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem. Int.* 1996; 29 (1): 37-42.
- Gessi, S, Varani, K, Merighi, S, Cattabriga, E, Pancaldi, C, Szabadkai, Y, Rizzuto, R, Klotz, K N, Leung, E, Mac Lennan, S, Baraldi, P G, Borea, P A. Expression, pharmacological profile, and functional coupling of A2B receptors in a recombinant system and in peripheral blood cells using a novel selective antagonist radioligand. *Mol. Pharmacol.* 2005; 67(6):2137-2147.
- Gerevich, Z, Illes, P. P2Y receptors and pain transmission. *Purinergic Signalling* 2004; 1: 3-10.
- Giménez-Llort, L, Fernández-Teruel, A, Escorihuela, R M, Fredholm, B B, Tobeña, A, Pekny, M, Johansson B. Mice lacking the adenosine receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 16: 547-550.

- Ginés, S, Hillion, J, Tornivem, M, Le Crom, S, Casadó, V, Canela, E I, Rondin, S, Lew, J Y, Watson, S, Zoli, M, Agnati, L F, Lluis, C, Ferré, S, Fuxe, K, Franco, R., Dopamine D₁ and adenosine A₁ receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; U.S.A. 97, 8606-8611.
- Gubitz, A K, Widdowson, L, Kurokawa, M, Kirkpatrick, K A, Richardson, P J. Dual signalling by the adenosine A_{2A} receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. *J Neurochem.* 1996; 67: 374-381.
- Guillet, R. Neonatal caffeine exposure alters adenosine receptor control of locomotor activity in the developing rat. *Dev. Pharmacol. Ther.* 1990; 15: 94-100.
- Guillet, R, Kellog, C. Neonatal exposure to therapeutic caffeine alters the ontogeny of adenosine A₁ receptors in brain of rats. *Neuropharmacol.* 1991; 30 (5): 489-496.
- Halldner, L, Lozza, G, Lindstrom, K, Fredholm, B B. Lack of tolerance to motor stimulant effects of a selective adenosine A(2A) receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 406 (3): 345-354.
- Halldner, L, Adén, U, Dahlberg, V, Johansson, B, Ledent, C, Fredholm, B B. The adenosine A₁ receptor contributes to the stimulatory, but not the inhibitory effect of caffeine on locomotion: a study in mice lacking adenosine A₁ and/or A_{2A} receptors. *Neuropharm.* 2004; 46: 1008-1017.
- Herrick-Davis, K, Chippari, S, Luttinger, D, Ward, S J. Evaluation of adenosine agonist as potential analgesics. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; 162 (2): 365-369.
- Hestrin, S. Different glutamate receptor channels mediate fast excitatory cortical neurons. *Nature.* 1992; 357: 686-689.
- Hillion, J, Canals, M, Torvinen, M, Casado, V, Scott, R, Terasmaa, A, Hansson, A, Watson, S, Olah, M E, Mallol, J, Canela, E I, Zoli, M, Agnati, L F, Ibanez, C F,

- Lluis, C, Franco, R, Ferre, S, Fuxe, K. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A_{2A} receptors and dopamine D₂ receptors. *J. Bio. Chem.* 2002; 277 (20): 18091-18097.
- Hindley, S, Herman, M A, Rathbone, M P. Stimulation of reactive astrogliosis in vivo by extracellular adenosine diphosphate or na adenosine A₂ receptor agonist. *J. Neurosci. Res.* 1994; 38 (4): 399-406.
- Inoue, K, Tsuda, M, Koizumi, S. ATP receptors in pain sensation: Involvement of spinal microglia and P_{2X}₄ receptors. *Purinergic Signalling.* 2005; 1: 95-100.
- Johansson, B, Ahlberg, S, Ploeg, I van der, Brené, S, Lindfors, N, Persson, H, Fredholm, B B. Effect of long term caffeine treatment on A₁ and A₂ adenosine receptor binding and on mRNA levels in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1993; 347: 407-414.
- Joseph, S. M., Buchakjian, M. R., and Dubyak, G. R.. Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 23331–23342.
- Kafka, S H, Corbett, R. Selective A_{2A} receptor/dopamine D₂ receptor interactions in animal models of schizophrenia. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 295 (2-3): 147-154.
- Karcz-Kubicha, M, Antoniou, K, Terasmaa, A, Quarta, D, Solinas, M, Justinova, A, Pezzola, A, Regio, R, Muller, C E, Fuxe, K, Goldberg, S R, Popoli, P, Ferre, S. Involvement od adenosine A₁ and A_{2a} receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28(7):1281-1291.
- Kegel, B, Braun, N, Heine, P, Maliszewski, C R, Zimmermann, H. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacol.* 1997; 36 (9): 1189-1200.

- Keil, G J, DeLander, G. E. Spinally-mediated antinociception is induced in mice by an adenosine kinase-, but not by an adenosine deaminase-, inhibitor. 1992; *Life Sci.* 51, PL171–PL176.
- Kessey, K, Mogul, D J. Adenosine A2 receptors modulate hippocampal synaptic transmission via a cyclic-AMP-dependent pathway. *Neurosci.* 1998; 84 (1): 59-69.
- Khasar, S G, Wang, J F, Taiwo, Y O, Heller, P H, Green, P G, Levine J, D. Mu-opioid agonist enhancement of prostaglandin-induced hyperalgesia in the rat: A G-protein $\beta\gamma$ subunit-mediated effect? *Neurosci.* 1995; 67 (1): 189-195.
- Kirk, I P, Richardson, P J. Inhibition of striatal GABA release by the adenosine A2a receptor is not mediated by increases in cyclic AMP. *J Neurochem.* 1995; 64 (6): 2801-2809.
- Klotz, K. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2000; 362: 382-391.
- Kukulski, F, Lévesque, S A, Lavoie, É G, Lecka, J, Bigonnesse, F, Knowles, S, Robson, S C, Kirley, T L, Sévigny, J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling.* 2005; 1: 193-204.
- Latini, S, Pazzagli, M, Pepeu, G, Pedata, F. A2 adenosine receptors: their presence and neuromodulatory role in the central nervous system. *Gen. Pharmacol.* 1996; 27 (6): 925-933.
- Latini, S, Pedata, F. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 2001; 79, 463–484.
- Lee, Y W, Yaksh, T L. Pharmacology of the spinal adenosine receptor which mediates the antiallodynic action of intrathecal adenosine agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 277 (3): 1642-1648.

- Léon, D, Albasanz, J L, Ruíz, M A, Fernadéz, M, Martín, M. Adenosine A₁ receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J. Neurochem.* 2002; 82: 625-634.
- León, D, Albasanz, J L, Ruíz, M A, Martín, M. Chronic caffeine or theophylline intake during pregnancy inhibits A₁ receptor function in the rat brain. *Neurosci.* 2005; 131: 481-489.
- Lipska, B ,K Halim, N D, Segal, P N, Weinberger, D R. Effects of reversible inactivation of the neonatal ventral hippocampus on behavior in the adult rat. *J. Neurosci.* 2002; 22 (70): 2835-2842.
- Liu, X J, White, T D, Sawynok, J. Involvement of primary sensory afferents, postganglionic sympathetic nerves and mast cells in the formalin-evoked peripheral release of adenosine. *Eur J Pharmacol.* 2001; 429 (1-3): 147-55.
- Liu, X J, White, T D, Sawynok, J. Enhanced release of adenosine in rat hind paw following spinal nerve ligation: involvement of capsaicin-sensitive sensory afferents. *Neuroscience.* 2002; 114 (2): 379-387.
- Londos, C; Cooper, D M.; Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77 (5): 2551-2554.
- Lopes, L V, Cunha, R A, Ribeiro, J A. Cross-talk between A₁ e A_{2A} adenosine receptors in the hippocampus and córtex of Young adult and old rats. *J. Neurophysiol.* 1999; 82, 3196-3203.
- Macek, T, Schaffhauser, H, Conn, P J. Protein kinase C and A₃ adenosine receptor activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function and uncouple mGluRs from GTP-binding proteins. *J. Neurosci.* 1998; 18 (16): 6138-6146.

- Marcus, A J, Broekman, M J, Drosopoulos, J H, Islam, N, Alyonycheva, T N, Safier, L B, Hajjar, K A, Posnett, D N, Schoenborn, M A, Schooley, K A, Gayle, R B, Maliszewski, C R. *J. Clin. Invest.* 1997; 99 (6): 1351-1360.
- Manzoni, O J, Manabe, T, Nicoll, R A. Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science.* 1994; 265: 2098-2101.
- Megson, A C, Dickenson, J M, Townsend-Nicholson, A, Hill, S. Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1-receptors and constitutive P2-purinoreceptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol.* 1995; 115 (8): 1415-1424.
- Millar, D, Schimidt, B. Controversies surrounding xanthine therapy. *Sem. Neonatol.* 2004; 9: 239-244.
- Mogul, D J, Adams, M E, Fox, A P. Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca^{2+} current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron.* 1993; 10 (2): 327-334.
- Moreau, J L, Huber, G. Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res Brain Res. Rev.* 1999;31 (1): 65-82.
- Munshi R, Pang IH, Sternweis PC, Linden J. A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. *J. Biol. Chem.* 1991; 266 (33): 22285-22289.
- Olney, J W. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990; 30: 40-71.
- Ongini, E, Fredholm, B B. Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1996; 17 (10): 364-372.
- Othman, T, Yan, H, Rivkees, S A. Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. *Glia.* 2003 Nov;44(2):166-172.

- Pan, W J, Osmanovic, S S, Shefner, S A. Characterization of the adenosine A₁ receptor-activated potassium current in rat locus ceruleus neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 273 (1): 537-544.
- Parkinson FE, Zhang Y W, Shepel P N, Greenway S C, Peeling J, Geiger J D: Effects of nitrobenzylthioinosine on neuronal injury, adenosine levels, and adenosine receptor activity in rat forebrain ischemia. *J. Neurochem.* 2000; 75 (2): 795-802.
- Peterfreund, R A, MacCollin M, Gusella, J, Fink J S. Characterization and expression of the human A_{2A} adenosine receptor gene. *J. Neurochem.* 1996; 66 (1): 362-368.
- Phillis, J W, Wu, P H. The effect of various centrally active drugs on adenosine uptake by the central nervous system. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 1982; 72 (2): 179-187.
- Poon, A, Sawynok, J. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of an adenosine kinase inhibitor and an adenosine deaminase inhibitor. *Eur J Pharmacol.* 1999; 384 (2-3): 123-138.
- Popoli, P, Gimenez-Llort, L, Pezzola, A, Reggio, R, Martinez, E, Fuxe, K, Ferre, S. Adenosine A₁ receptor blockade selectively potentiates the motor effects induced by dopamine D₁ receptor stimulation in rodents. *Neurosci. Lett.* 1996; 218 (3): 209-213.
- Ralevic, V, Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50 (3): 413-492.
- Ramkumar, V, Stiles, G L, Beaven, M A, Ali, H. The A₃ adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (23): 16887-16890.
- Rebola, N, Coelho, J E, Costenla, A R, Lopes, L V, Parada, A, Oliveira, C R; Soares-Da-Silva, P; De Mendonca A; Cunha, R A. Decrease of adenosine A₁ receptor

- density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats. *Eur. J. Neurosci.* 2003; 18 (4): 820-828.
- Rebola, N, Canas, P M, Oliveira, C R, Cunha, R A. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neurosci.* 2005; 132 (4): 893-903.
- Rees, D A, Scanlon, M F, Ham, J. Adenosine signalling pathways in the pituitary gland: one ligand, multiple receptors. *J. Endocrinol.* 2003; 177: 357–364.
- Reeve, A J, Dickenson, A H, Kerr, N C. Spinal effects of bicuculline: modulation of an allodynia-like state by an A1-receptor agonist, morphine, and an NMDA-receptor antagonist. *J. Neurophysiol.* 1998; 79 (3): 1494-1507.
- Ribeiro, J A. Adenosine A2A receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 375 (1-3): 101-113.
- Ribeiro, J A, De Mendonça, A, Correia-de-Sá, P, Cunha, R A, Sebastião, A M. Purinoceptors and synaptic plasticity. *Drug Dev. Res.* 1996; 39: 353-360.
- Ribeiro, J A, Sebastião, A M, de Mendonça, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* 2003; 68: 377-392.
- Rimondini R, Ferré, S, Giménez-Llort, L, Ogren, S O, Fuxe, K. Differential effects of selective adenosine A1 and A2A receptor agonists on dopamine receptor agonist-induced behavioural response in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 347 (2-3): 153-158.
- Rivkees, S A, Zhao, Z, Porter, G, Turner, C. Influences of adenosine on the fetus and newborn. *Mol. Genet. Metab.* 2001; 74: 160-171.
- Ross, G W, Petrovitch, H. Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. *Drugs Aging.* 2001; 18 (11): 797-806.

- Rosi, S, McGann, K, Hauss-Wegrzyniak, B, Wenk, G L. The influence of brain inflammation upon neuronal adenosine A₂B receptors. *J Neurochem.* 2003; 86(1): 220-227.
- Salter, M W, Hicks, J L. ATP-evoked increases in intracellular calcium in neurons and glia from the dorsal spinal cord. *J. Neurosci.* 1994; 14: 1563-1575.
- Sandner-Kiesling, A, Li, X, Eisenach, J C. Morphine-induced spinal release of adenosine is reduced in neuropathic rats. *Anesthesiol.* 2001; 95 (6): 1455-1459.
- Sawynok, J. Adenosine receptor activation and nociception. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 317: 1-11.
- Sawynok, J, Liu, X J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog. Neurobiol.* 2003; 69: 313-340.
- Sawynok, J, Yaksh, T L. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol. Rev.* 1993; 45 (1): 43-85.
- Sawynok, J, Downie, J W, Reid, A R, Cahill, C M, White, T D. ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain Res.* 1993; 610 (1): 32-38.
- Scholz, K P, Miller, R Z. Inhibition of synaptic transmission and calcium currents in cultured hippocampal neurons. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 1991; 635:167-176.
- Scholz, K P, Miller, R J. Presynaptic inhibition at excitatory hippocampal synapses: development and role of presynaptic Ca²⁺ channels. *J. Neurophysiol.* 1996; 76 (1): 39-46.
- Schwarzschild, M A, Chen, J, Chase, T N. A_{2A} antagonists for PD: A prime example of translational neuroscience. *Neurology.* 2003; 61 (6): S3-S4.
- Sebastião, A M, Ribeiro, J A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *TIPS.* 2000; 21, 341-346.

- Shi, J D, Kukar, T, Wang, C Y, Li, Q, Cruz, P E, Davoodi-Semiromi, A, Yang, P, Gu, Y, Lian, Wei, Wu, D H, She, J. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 17474-17478.
- Siegel, G J, Agranoff, B W, albers, R W, Molinoff, P B. *Basic Neurochemistry.* 1993; 5° edition, Ravens Press, New York, 1080pp.
- Sircar, R. Developmental maturation of the N-methyl-D-aspartic acid receptor channel complex in postnatal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2000; 18 (1): 121-131.
- Solinas, M, Ferré, S, You, Z B, Karcz-Kubicha, M, Popoli, P, Goldberg, S R. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 2002; 22(15):6321-6324.
- Svenningsson, P, Nomikos, G G, Fredholm, B B. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *J. Neurosci.* 1999; 19 (10): 4011-4022.
- Swanson, T H, Drazba J A, Rivkees, S A. Adenosine A1 receptors are located predominantly on axons in the rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurobiol.* 1995; 363 (4): 517-531.
- Sweeney, M I, White, T D, Sawynok, J. 5-Hydroxytryptamine releases adenosine and cyclic AMP from primary afferent nerve terminals in the spinal cord in vivo. *Brain Res.* 1990; 528 (1): 55-61.
- Tao, P, Liu, C. Chronic morphine treatment causes down-regulation of spinal adenosine A₁ receptors in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 215:301-304.
- Taiwo, Y O, Levine, J D. Direct cutaneous hyperalgesia induced by adenosine. *Neuroscience.* 1990; 38 (3): 757-762.

- Turner C P, Yan H, Schwartz M, Othman T, Rivkees S A: A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss. *NeuroReport*. 2002; 13:1199-1204.
- Trussell, L O, Jackson, M B. Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1985; 82 (14): 4857-4861.
- Van Calker D, Muller M, Hamprecht, B. Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature*. 1978; 276 (5690): 830-841.
- Wang J, Schaner ME, Thomassen S, Su SF, Piquette-Miller M, Giacomini KM. Functional and molecular characteristics of Na(+)-dependent nucleoside transporters. *Pharm Res*. 1997; 14 (11):1524-1532.
- Wang, T F, Guidotti, G. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res*. 1998; 790 (1-2): 318-322.
- Weaver D R: A₁ – adenosine receptor gene expression in fetal rat brain. *Dev Brain Res* 94: 205-223, 1996.
- White, T D, Downie, J W, Leslie, R A. Characteristics of K⁺ - and veratridine-induced release of ATP from synaptosomes prepared from dorsal and ventral spinal cord. *Brain Res*. 1985; 334 (2): 372-374.
- Wittendorp, M C, Boddeke, H W, Biber, K. Adenosine A₃ receptor-induced CCL2 synthesis in cultured mouse astrocytes. *Glia*. 2004; 46 (4): 410-418.
- Wu, L G, Saggau, P. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci*. 1997; 20 (5): 204-212.
- Yaar, R, Jones M R, Chen, J F, Ravid, K. Animals models for the study of adenosine receptor functions. *J. Cell. Physiol*. 2005; 202: 9-20.

- Yao, Y, Sei, Y, Abbracchio, M P, Jiang, J L, Kim, Y C, Jacobson, K A. Adenosine A3 receptor agonists protect HL-60 and U-937 cells from apoptosis induced by A3 antagonists. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 232 (2): 317-322.
- Zimmerberg, B, Carr, K L, Scott, A, Lee, H H, Weider, J M. The effects of postnatal caffeine exposure on growth, activity and learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991; 39 (4): 883-888.
- Zimmermann, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 1996; 49 (6): 589-618.
- Zimmermann, H. Ecto-nucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 2001; 52: 44-56.
- Zhong, H, Belardinelli, L, Maa, T, Zeng, D. Synergy between A2B adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2005; 32 (1): 2-8.