

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

TESE DE DOUTORADO

**NEUROPROTEÇÃO POR CAFEÍNA EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA
DE ALZHEIMER**

Janaína Espinosa Teixeira

Orientador: Prof.^a Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula

Porto Alegre, junho de 2015

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

TESE DE DOUTORADO

**NEUROPROTEÇÃO POR CAFEÍNA EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA
DE ALZHEIMER**

Janaína Espinosa Teixeira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, junho de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Espinosa Teixeira, Janaina
Neuroproteção por cafeína em modelo animal de Doença
de Alzheimer / Janaina Espinosa Teixeira. -- 2015.
62 f.

Orientadora: Lisiane de Oliveira Porciúncula.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Cafeína. 2. Doença de Alzheimer. 3. Memória. 4.
Receptores de adenosina. I. de Oliveira Porciúncula,
Lisiane, orient. II. Título.

“Science is more than a body of knowledge. It is a way of thinking; a way of skeptically interrogating the universe with a fine understanding of human fallibility. If we are not able to ask skeptical questions, to interrogate those who tell us that something is true, to be skeptical of those in authority, then, we are up for grabs for the next charlatan, political or religious, who comes rambling along.”

Carl Sagan

SUMÁRIO

PARTE I	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
I. INTRODUÇÃO	7
I.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	7
I.1.1 SINALIZAÇÃO DA INSULINA NO ENCÉFALO NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	10
I.1.2 MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDA POR STZ i.c.v.	13
I.2 METABOLISMO DA ADENOSINA.....	16
I.2.1 EFEITOS DA ADENOSINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	18
I.2.2 ADENOSINA E CONDIÇÕES PATOLÓGICAS.....	22
I.3 METABOLISMO DA CAFEÍNA	23
I.3.1 MECANISMO DE AÇÃO DA CAFEÍNA NO SNC.....	24
I.3.2 CAFEÍNA E DOENÇA DE ALZHEIMER.....	26
II. OBJETIVOS	28
PARTE II.....	29
CAPÍTULO I	30
PARTE III	41
III. DISCUSSÃO	42
IV. CONCLUSÃO	45
V. PERSPECTIVAS	47
VI. REFERÊNCIAS	48

PARTE I

RESUMO

A cafeína é a substância psicoativa mais consumida no mundo. Ela aumenta o estado de alerta, estabiliza o humor e também pode proporcionar melhora no desempenho cognitivo. Diversos estudos epidemiológicos e com roedores indicam uma relação inversa entre consumo de cafeína (um antagonista dos receptores de adenosina) e o comprometimento da memória associado ao envelhecimento e à Doença de Alzheimer. Considerando que o comprometimento da sinalização encefálica da insulina é um componente importante da fisiopatologia da Doença de Alzheimer, a estreptozotocina vem sendo utilizada, via intracerebroventricular, para produzir um modelo de Doença de Alzheimer com características neuroquímicas, fisiopatológicas e comportamentais semelhantes à Doença de Alzheimer em humanos. Dessa forma, esta tese teve como objetivo avaliar as alterações dos receptores de adenosina e a imunoreatividade neuronal no hipocampo de ratos submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, bem como um possível efeito protetor da cafeína sobre esses parâmetros e sobre a memória de reconhecimento. Como resultado, encontramos comprometimento da memória, modificação do imunoconteúdo e da expressão do receptor de adenosina A2A e perda neuronal no hipocampo no modelo animal de Doença de Alzheimer. O tratamento crônico com cafeína foi eficaz na prevenção do comprometimento da memória e das alterações neuronais observadas no hipocampo do modelo de Doença de Alzheimer. Essas observações fornecem suporte adicional para a possibilidade de que o consumo de cafeína poderia ser uma estratégia para prevenir o déficit mnemônico. No entanto, o efeito positivo da cafeína foi observado somente no modelo de Doença de Alzheimer. Nos animais controles, a cafeína não produziu nenhum efeito sobre a memória.

ABSTRACT

Caffeine is the most consumed psychoactive substance in the world, utilized to increase alertness, stabilize humor and enhance cognitive performance. Several epidemiological and animal studies indicate an inverse correlation between caffeine intake (an adenosine receptors antagonist) and memory impairment associated with ageing and Alzheimer's disease. Considering that impaired brain insulin signaling is a main feature of Alzheimer's disease, intracerebroventricular streptozotocin has been used as a model of Alzheimer's disease with features resembling those of Alzheimer's disease patients. Therefore, the aim of this thesis was to evaluate the adenosine receptors immunocontent and neuronal immunoreactivity in the hippocampus of rats submitted to intracerebroventricular streptozotocin, as well as a possible protective effect of caffeine on these parameters and on recognition memory. The results showed memory impairment, modification of A2A adenosine receptor immunocontent and neuronal loss in the hippocampus of the animal model of Alzheimer's disease induced by streptozotocin. Chronic caffeine treatment was effective in preventing the memory impairment and neuronal changes observed in Alzheimer's disease rats. These assessments provide additional support for the hypothesis that caffeine consumption might be a valid strategy in preventing mnemonic deficit. Nonetheless, the positive effects of caffeine consumption were observed only among Alzheimer's disease rats. Caffeine consumption had no effect over control animal's performance.

LISTA DE ABREVIATURAS

5'NT	5'nucleotidase
A1	receptor de adenosina subtipo A1
A2A	receptor de adenosina subtipo A2A
Aβ	peptídeo β -amilóide
ADA	adenosina desaminase
ADK	adenosina cinase
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
APP	proteína precursora do amiloide
ATP	adenosina trifosfato
DA	Doença de Alzheimer
DNA	ácido desoxirribonucleico
GABA	ácido gama-aminobutírico
GLUT2	transportador de glicose tipo 2
GSK-3	glicogênio sintase quinase-3
i.c.v.	intracerebroventricular
LTP	potenciação de longa duração
MAPK	proteína quinase mitogênica ativada
MAPT	proteína tau associada ao microtúbulo
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NAD⁺	dinucleotídeo de adenina nicotinamida
NeuN	marcador nuclear de neurônios
NMDA	receptor de glutamato subtipo N-metil-D-aspartato
PFC	cortex pré-frontal
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase

qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
RI	receptor de insulina
SAH	S-adenosil-homocisteína
SNC	sistema nervoso central
STZ	estreptozotocina

I. INTRODUÇÃO

I.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) é uma síndrome neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva da memória, compreensão, capacidade de aprendizado e julgamento, levando a incapacitação para as atividades cotidianas (Neugroschl e Sano, 2009). É a forma mais comum de demência, compreendendo de 60 a 80% dos casos. O número de pacientes com DA e outros tipos de demências aumentou drasticamente nas últimas décadas. Atualmente, aproximadamente 14 milhões de indivíduos na Europa e nos Estados Unidos possuem DA, incluindo mais de 40% da população acima de 85 anos de idade (Thies e Bleiler, 2011). Nos Estados Unidos, a DA é a sexta principal causa de morte e os custos anuais associados à doença em 2013 foram de US\$ 220 bilhões nos Estados Unidos e mais de US\$ 600 bilhões no mundo todo, particularmente em países industrializados (Reitz et al., 2011).

As modificações patológicas da DA se iniciam no lobo temporal medial e subsequentemente avançam para áreas associadas ao neocórtex (Blennow et al., 2006). Essas alterações iniciam nas décadas anteriores ao surgimento dos sintomas clínicos da doença (Price e Morris, 1999; de Leon et al., 2001) e a progressão da DA se dá em três estágios: (a) estágio pré-clínico assintomático, (b) estágio pródromo que inclui sintomas moderados (e.g., alterações da memória episódica) e (c) estágio sintomático com apresentação de demência (Dubois et al., 2007). O diagnóstico precoce da DA baseado somente em sintomas clínicos permanece um desafio, particularmente no estágio pródromo (Aluise et al., 2008). Essa dificuldade é refletida na baixa acurácia do diagnóstico clínico da DA utilizando métodos que não incluem informações sobre biomarcadores (Beach et al., 2012).

Embora a etiologia da DA ainda não esteja bem descrita, duas características neuropatológicas são comumente encontradas no encéfalo de pacientes com DA: placas senis compostas por peptídeo β -amilóide ($A\beta$); e emaranhados neurofibrilares contendo proteína Tau hiperfosforilada (Selkoe, 2001). As placas amiloides são compostas principalmente por peptídeos provenientes da clivagem enzimática da Proteína Precursora do β -amilóide (APP) (Kang et al., 1987). Em humanos, essa proteína transmembrana é codificada por um gene no cromossomo 21 e, via *splicing* alternativo, este gene pode resultar na expressão de pelo menos oito formas diferentes da APP. A forma conhecida como APP 695 (*i.e.*, a forma que consiste de 695 resíduos de aminoácidos) é expressa predominantemente no encéfalo (Panegyres, 1997). O papel fisiológico da APP ainda não está totalmente esclarecido. No entanto, se postula que a APP esteja envolvida nos processos de adesão celular, uma vez que essa proteína está localizada junto à integrinas em sítios de adesão celular (Storey et al., 1996; Yamazaki et al., 1997). Outra função atribuída a APP é o de fator trófico, visto que a APP estimula o crescimento de neuritos e outras linhagens celulares (Hung et al., 1992). O domínio extracelular da APP sofre clivagem pelas secretases do tipo α ou β , enquanto a porção transmembrana remanescente é clivada pela secretase do tipo γ (Hardy e Selkoe, 2002; Thinakarann e Koo, 2008). Embora a clivagem pela α -secretase libere produtos solúveis e classificados como não tóxicos ou neurotróficos, a clivagem pela β -secretase inicia um processamento patogênico e amiloidogênico da APP. Após a ação da β -secretase, o fragmento remanescente no interior do domínio transmembrana sofre ação da γ -secretase. A clivagem pela γ -secretase gera, nessa cascata, peptídeos cujo comprimento varia entre 38 a 43 resíduos de aminoácidos, sendo o peptídeo de 42 resíduos ($A\beta_{42}$) o associado à DA.

A proteína Tau pertence à família das proteínas associadas ao microtúbulo encontradas nas células neuronais e não-neuronais (Hanger et al., 2014). O gene da proteína Tau humana (MAPT) está localizado no braço longo do cromossomo 17. A proteína Tau está envolvida na promoção da nucleação e alongação dos microtúbulos, e se postula que a fosforilação da proteína Tau é um fator importante na regulação da interação entre Tau e microtúbulo (revisado por Wang et al., 2014). Em contrapartida, estudos recentes sugerem que a proteína Tau também exerce papel patofisiológico (Karch et al., 2012; Pooler et al., 2013). A hiperfosforilação da Tau faz com que essa proteína se desligue dos microtúbulos, provocando a sua desestabilização e comprometendo o transporte axonal (Bramblett et al., 1993; Ishihara et al., 1999). O alastramento da patologia da Tau no encéfalo de pacientes portadores da DA se correlaciona com o padrão de disfunção cognitiva observado clinicamente (Nelson et al., 2012).

Quanto à etiologia, a DA é classificada como (1) familiar ou (2) esporádica. Uma pequena percentagem dos casos de DA – algo entre 1% ou menos – se desenvolve como resultado de mutações genéticas familiares. Essas mutações envolvem o gene codificador da Proteína Precursora do Amilóide (APP) e os genes codificadores das proteínas Presenilina 1 (PSEN1) e Presenilina 2 (PSEN2). A herança de qualquer uma destas mutações genéticas determinará o desenvolvimento de DA. Nesses indivíduos, os sintomas da doença tendem a se desenvolver antes dos 65 anos de idade. Em alguns casos, os sintomas podem surgir ainda mais precocemente, em torno dos 30 anos de idade. No entanto, a maioria dos indivíduos diagnosticados com DA desenvolvem o tipo esporádico, de início tardio, no qual os sintomas ocorrem a partir dos 65 anos de idade (Bekris et al., 2010). Além disso, a

DA esporádica não está relacionada às mutações observadas na DA do tipo familiar (Reitz et al., 2011).

I.1.1 SINALIZAÇÃO DA INSULINA NO ENCÉFALO NA DOENÇA DE ALZHEIMER

O papel da insulina no SNC tem sido pouco documentado quando comparado com suas funções no músculo esquelético e tecido adiposo. No entanto, sabe-se que a insulina e os receptores de insulina possuem funções no SNC que não estão necessariamente associadas ao metabolismo da glicose, como a promoção do aumento da expressão da proteína de ancoragem pós-sináptica PSD-95 (do inglês, *postsynaptic density protein* - PSD) na região CA1 do hipocampo (Lee et al., 2005), a regulação da formação dos espinhos dendríticos e o desenvolvimento das sinapses excitatórias nos neurônios hipocámpais (Lee et al., 2011).

O mecanismo exato pelo qual a insulina afeta o aprendizado e a memória ainda não está totalmente esclarecido, mas algumas vias têm sido propostas. Sabe-se que a insulina está envolvida na neuromodulação por meio da ativação dos receptores de glutamato subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (van der Heide et al., 2006). A ativação do receptor NMDA é necessária para o fenômeno de potenciação de longa duração (*long-term potentiation* ou LTP) no hipocampo, amígdala e septo medial (Collingridge et al., 1983; Maren et al., 1996; Elvander-Tottie et al., 2006).

Embora a maior parte da insulina presente no encéfalo seja produzida periféricamente e transportada para o SNC por meio de carreadores saturáveis na barreira hematoencefálica (Banks, 2004), uma quantidade menor da insulina é produzida no encéfalo, principalmente nas células piramidais do hipocampo e córtex pré-frontal medial, córtex entorrinal, córtex perirrinal, tálamo, camada granular do

bulbo olfatório e hipotálamo (Grünblatt et al., 2007; Schechter et al., 1996; Devaskar et al., 1994). Os receptores de insulina (RI) estão localizados predominantemente no bulbo olfatório, hipotálamo, córtex cerebral, cerebelo e hipocampo (Abbott et al., 1999). Os RI nos neurônios diferem dos RI periféricos, pois os receptores neuronais não sofrem regulação negativa pela insulina (Boyd e Raizada, 1983). A ligação da insulina induz a auto-fosforilação da subunidade β do receptor, acionando a atividade da tirosina cinase e ativando duas vias de transdução paralelas: uma atuando pela via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e a outra atuando pela via da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) (Johnston et al., 2003). A ativação da via PI3K por sua vez ativa a proteína cinase B (Akt/PKB) envolvida no metabolismo da glicose e na inativação da GSK-3. Quando ativada, a isoforma alfa da GSK-3 (GSK-3 α) regula a produção do A β (Figura 1). Além disso, a sinalização da insulina via ativação da PI3K também regula a liberação do APP no espaço extracelular (Phiel et al., 2003). Portanto, disfunção na sinalização da cascata RI-PI3K pode levar ao surgimento das alterações características da DA – hiperfosforilação da proteína Tau e aumento da produção do A β . Além disso, um número crescente de evidências indica que há comprometimento da sinalização da insulina no encéfalo nos estágios iniciais da DA (artigo de revisão de Cole e Frautschy, 2007). Dados provenientes de estudos *post mortem* têm demonstrado diminuição do conteúdo de insulina e do mRNA de seus receptores em amostras de córtex cerebral e hipocampo, bem como modificações das isoformas alfa e beta da GSK-3 (Steen et al., 2005).

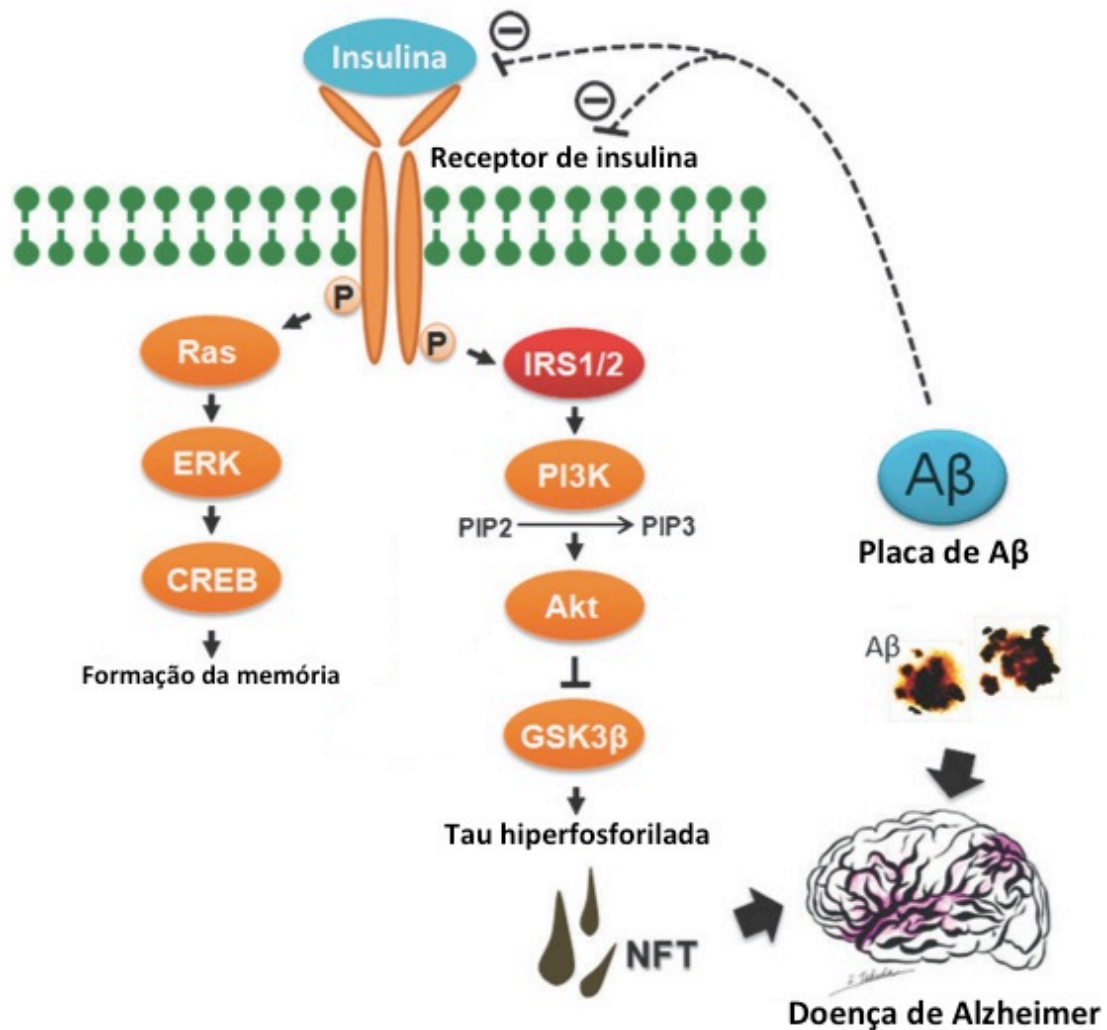


Figura 1. Sinalização da insulina, memória e Doença de Alzheimer. A sinalização da insulina modula a memória e a patologia da Doença de Alzheimer. A GSK-3 β é um regulador chave da fosforilação da proteína Tau. A proteína Tau hiperfosforilada é o principal componente dos NFT. O A β modula a sinalização da insulina e pode comprometer o aprendizado e a memória. IRS = substrato do receptor de insulina; PI3K = fosfatidilinositol-3-cinase; ERK = cinase regulada por sinal extracelular; CREB = proteína de ligação a elemento responsiva a cAMP; PIP2 = fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PIP3 = fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; GSK = glicogênio sintase cinase; NFT = emaranhado neurofibrilar (adaptado de Takeda et al., 2010).

No diabetes tipo 2, uma sinalização aberrante do fator de necrose tumoral α (TNF- α) leva a ativação da c-Jun N-terminal cinase (JNK) (Hirosumi et al., 2002). A JNK ativada promove a fosforilação do RI tipo 1 (IR-1), bloqueando a sinalização da

insulina e causando resistência periférica à insulina (Gregor e Hotamisligil, 2011). De maneira semelhante, foi demonstrado que fragmentos solúveis do A β induz uma sinalização aberrante da via TNF- α /JNK e inibição do RI-1 nos neurônios primários do hipocampo (Bomfim et al., 2012; Ma et al., 2009). A inibição do RI-1 também foi observada no encéfalo de um modelo transgênico de DA (Bomfim et al., 2012). A relevância clínica desses achados é confirmada pela demonstração de que o RI-1 fosforilado está elevado e a JNK está ativa no encéfalo de indivíduos com DA (Talbot et al., 2012). Indícios do mecanismo molecular pelo qual o encéfalo de pacientes com DA se torna resistente à insulina também vêm de estudos demonstrando que os fragmentos solúveis do A β promovem a remoção dos RI da membrana plasmática em cultura de neurônios do hipocampo (De Felice et al., 2009; Zhao et al., 2008), levando à redução da atividade tirosina cinase do RI.

I.1.2 MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDA POR STZ i.c.v.

Em 1969, Junod e colaboradores demonstraram que uma única administração intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar produz aumento dos níveis séricos de glicose, aumento do volume urinário e redução dos níveis de insulina sérica e pancreática (Junod et al., 1969). Atualmente, a administração intraperitoneal de STZ na dose de 40-60 mg/kg é considerado um modelo animal de diabetes tipo 1 (Degenhardt et al., 2002). A STZ é captada pelas células β -pancreáticas via transportadores de glicose tipo 2 (GLUT2) e, uma vez dentro da célula, o grupamento metil-nitrosurea promove a alquilação do DNA. Em resposta, a enzima de reparo poli-ADP-ribose polimerase (PARP) é ativada, resultando na depleção do NAD⁺ e consequente depleção dos estoques de ATP. Essa depleção de ATP – o estoque de

energia celular – resulta em necrose das células β -pancreáticas (Figura 2). Além das células β -pancreáticas produtoras de insulina, a STZ também tem efeitos sobre outros órgãos que expressam GLUT2. A administração intraperitoneal de STZ não exerce efeito sobre o encéfalo, pois a STZ não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica devido a ausência de GLUT2 (revisado por Lenzen, 2008). No entanto, em um estudo recente (Wang et al., 2014), ratos com diabetes induzida por STZ apresentaram baixo desempenho nas tarefas de labirinto aquático e esQUIVA inibitória.

A partir de evidências sobre a interação entre metabolismo da glicose e cognição (Hoyer, 1998) e de estudos *post mortem* indicando a presença de resistência a insulina no encéfalo de pacientes com DA (Hoyer 2004; de la Monte e Wands 2005; Steen et al. 2005) e sua correlação com a severidade da doença, a administração i.c.v. de STZ tem sido proposta como um modelo não transgênico de DA (Lannert e Hoyer, 1998; Salkovic-Petrisic e Hoyer, 2007). A administração i.c.v. de STZ em dose subdiabetogênica (1-3 mg/kg) induz déficits cognitivos (Lannert e Hoyer, 1998), comprometimento da sinalização colinérgica (Blokland e Jolles, 1994), estresse oxidativo (Saxena et al., 2011), redução do metabolismo encefálico da glicose (Hoyer e Lannert, 2007) e resistência à insulina no encéfalo (Agrawal et al., 2011). Também foi demonstrado que o aumento do imunocontéudo cortical de MAPT hiperfosforilada e do A β são consequências a longo prazo da injeção i.c.v. de STZ, assim como o acúmulo de placas senis (Lester-Coll et al., 2006).

Além disso, análise por Western blot revelou aumento do imunocontéudo da forma fosforilada da GSK-3 β no encéfalo de ratos após infusão i.c.v. de STZ (Salkovic-Petrisic et al., 2006). A GSK-3 β fosforilada (inativa) tem papel chave na

hiperfosforilação da MAPT e no processamento amiloidogênico da APP (Ferrer et al., 2002).

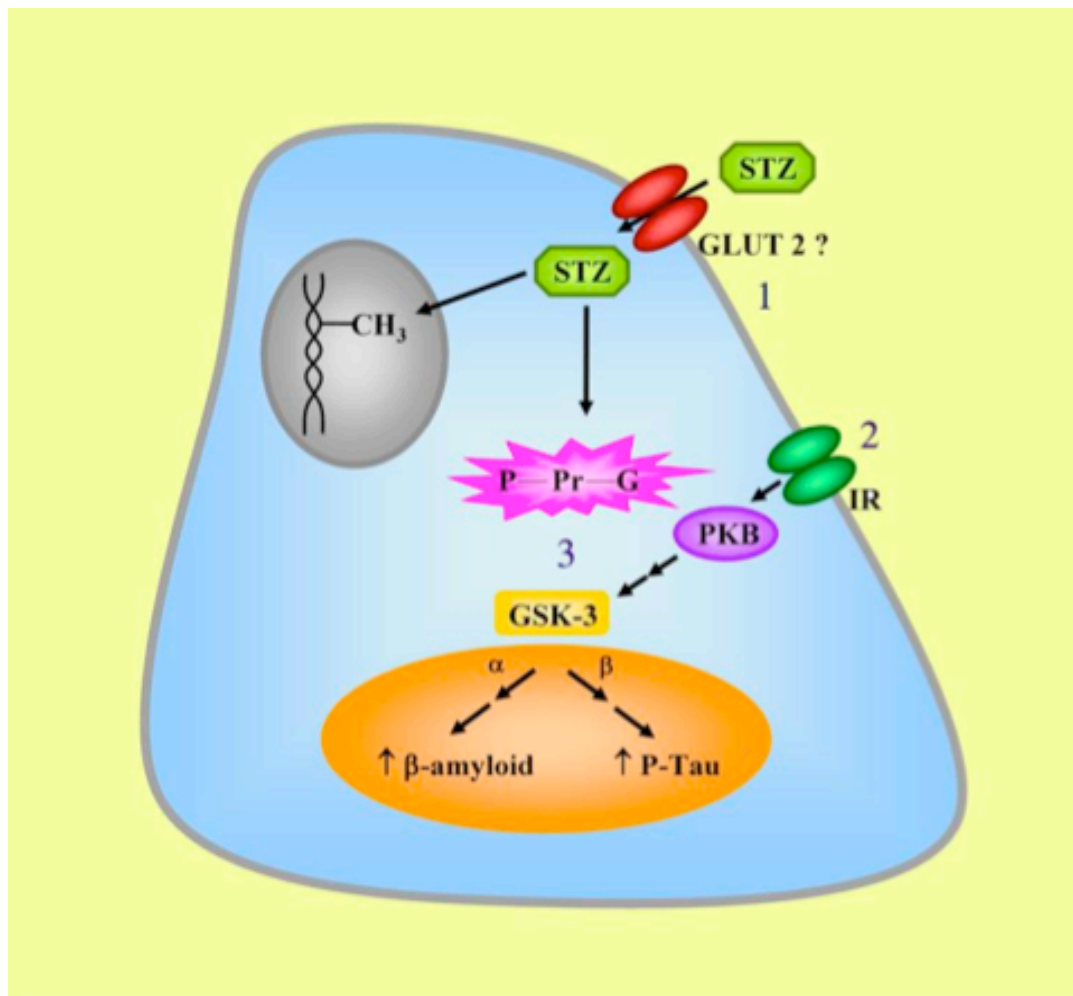


Figura 2. Mecanismo de ação da STZ na célula neuronal ou astrocitária. 1. Entrada através do transportador de glicose tipo 2 (GLUT2) em neurônio ou astrócito; 2. Ação sobre o receptor de insulina (IR); 3. Consequente comprometimento da via da enzima glicogênio sintase cinase 3 (GSK 3) por desequilíbrio da fosforilação/glicação de proteínas na célula neuronal. (adaptado de Handbook of Animal Models in Alzheimer's Disease By G. Casadesus).

O comprometimento do aprendizado e memória produzido por STZ i.c.v. é progressivo e de longo prazo. Duas semanas após a injeção i.c.v de STZ, a retenção da memória em esQUIVA inibitória foi reduzida, mas não foi observado efeito significativo sobre a memória espacial avaliada no labirinto aquático de Morris

(Mayer et al., 1990). No entanto, em maior dose, a STZ promoveu comprometimento da memória espacial (Agrawal et al., 2010) e da memória de reconhecimento (Shoham et al., 2007).

PATOLOGIA	MODELO STZ i.c.v.	DOENÇA DE ALZHEIMER (HUMANO)
COMPORTAMENTAL déficit cognitivo	aprendizado e memória	demência
MORFOLOGIA gliose perda sináptica	+ +	+ +
METABÓLICA glicose / energética	metabolismo reduzido	metabolismo reduzido
NEUROQUÍMICA estresse oxidativo transmissão colinérgica sinalização do RI	+ reduzida resistência à insulina no encéfalo	+ reduzida resistência à insulina no encéfalo
MARCADORES DA DOENÇA proteína tau amilóide β	hiperfosforilada angiopatia amilóide	emaranhados neurofibrilares placas de amilóide β

Figura 3. Comparação entre o modelo de Doença de Alzheimer induzida pela administração i.c.v. de STZ e a Doença de Alzheimer em humanos. (tabela compilada a partir das revisões de Hoyer, 2004 e Salkovic-Petrisic & Hoyer, 2007).

I.2 METABOLISMO DA ADENOSINA

A adenosina é uma molécula sinalizadora presente no meio extracelular e em virtualmente todas as células, estando envolvida em funções essenciais na fisiologia humana. Desde os processos de transferência de energia por meio da adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato até a sinalização celular, a adenosina é fundamental para a biologia humana (Eltzschig, 2009). A adenosina está sempre presente no meio intra e extracelular, uma vez que esta molécula está no cruzamento entre diferentes vias metabólicas. As concentrações de adenosina nas células e

interstício estão na ordem de nM em condições fisiológicas, mas aumentam substancialmente sob diferentes condições de estresse celular.

A adenosina intracelular é formada principalmente a partir da ação da endo-5'-nucleotidase (5'NT) sobre o AMP (Schubert et al., 1979; Zimmermann, 2000). A adenosina também pode resultar da hidrólise da S-adenosil-homocisteína (SAH) (Deussen et al., 1989). No sistema nervoso central, a adenosina extracelular tem três principais origens: (1) liberação da adenosina por meio dos transportadores equilibrativos de nucleosídeos (ENT) após um aumento da concentração extracelular de adenosina (Baldwin et al., 2004). O fluxo da adenosina através da membrana celular depende do gradiente de concentração entre o meio extra e intracelular (Tabrizchi e Bedi, 2001) e a captação da adenosina do meio extracelular é uma função fundamental para a manutenção da homeostase (Deussen, 2000). (2) Conversão extracelular dos nucleotídeos de adenina em adenosina pelas ecto-nucleotidases. As concentrações intracelulares de ATP são bastante altas (na ordem de mM), portanto, uma lesão celular transitória ou permanente levará a um aumento massivo da concentração extracelular de ATP e rápida formação de adenosina. Os grupamentos fosfato do ATP extracelular são rapidamente clivados pela ação conjunta das ecto-enzimas, inicialmente pela nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase, seguida de hidrólise pela ecto-5'-nucleotidase (Picher et al., 2003; Robson et al., 2005). (3) Formação extracelular da adenosina após a liberação do cAMP (Rosenberg e Li, 1995). No entanto, foi demonstrado que essa via de formação da adenosina é pouco relevante (Brundege et al., 1997).

Duas enzimas desempenham papel chave no catabolismo da adenosina: a adenosina desaminase (ADA) e a adenosina cinase (ADK). A ADA é uma enzima com elevado Km, enquanto a ADK possui baixo Km. Quando a ADA é bloqueada ou

geneticamente deletada, a capacidade da ADK é excedida e os níveis de adenosina podem se elevar drasticamente (Hershfield, 2005).

Em humanos e roedores, a adenosina se liga a quatro subtipos de receptores: A1, A2A, A2B e A3. Todos os subtipos de receptores de adenosina são acoplados à proteína G. A ativação do receptor A1 inibe a atividade da adenilato ciclase, ativa os canais de potássio, bloqueia os canais transitórios de cálcio e aumenta o cálcio e o inositol trifosfato intracelular ao ativar a fosfolipase C. Já a ativação do receptor A2A estimula a via da proteína cinase dependente de cAMP pelo acoplamento da proteína G estimulatória (Fredholm et al., 2005). As concentrações de adenosina presentes em condições basais são suficientes para ativar os receptores A1, A2A e A3 em regiões onde esses receptores são abundantemente expressos. Em contrapartida, são necessárias concentrações maiores de adenosina para ativar o receptor A2B e se acredita que essas altas concentrações estão presentes durante condições patológicas extremas. É importante enfatizar que a potencia da adenosina como um agonista é bastante dependente da densidade dos receptores. Quando o número de receptores é reduzido pela metade (e.g., um camundongo que possui apenas uma cópia do gene para o receptor), será necessário o dobro da quantidade do agonista para ativar o receptor (Johansson et al., 2001).

I.2.1 EFEITOS DA ADENOSINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Além do papel fundamental no controle do metabolismo celular, a adenosina também desempenha funções restritas ao sistema nervoso central (SNC). A adenosina é classificada como neuromodulador por não preencher os critérios para ser classificado como neurotransmissor clássico (*i.e.*, ser sintetizado em sinapses específicas e armazenado em vesículas, ser liberado por meio da despolarização da

membrana neuronal, promover despolarização ou hiperpolarização de neurônios pós-sinápticos, possuir mecanismo específico de inativação e ter sua ação mimetizada pela administração de um análogo exógeno) (Cunha, 2001). O conceito de neuromodulação diz respeito a substâncias endógenas que influenciam a liberação (modulação pré-sináptica) ou a ação de um neurotransmissor (modulação pós-sináptica) (Ribeiro e Sebastião, 2010).

Até o presente momento, foram clonados quatro subtipos de receptores de adenosina em humanos e roedores – A1, A2A, A2B e A3. Os receptores de adenosina estão localizados na membrana celular e pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (Fredholm et al., 2000), podendo atuar de maneira inibitória (via receptores A1 e A3) ou facilitatória (via receptores A2A e A2B) (Linden, 2001). Embora existam quatro tipos de receptores de adenosina (A1, A2A, A2B e A3), o impacto da adenosina nas funções encefálicas se dá majoritariamente pelas ações dos receptores A1 e A2A. Tanto os receptores A1 quanto os receptores A2A são abundantemente expressos no encéfalo, enquanto a manipulação dos receptores A2B e A3 produz efeitos bastante modestos sobre as funções do SNC (Fredholm et al., 2005). O receptor A1 é o receptor com maior afinidade pela adenosina (Daly e Padgett, 1992). Esse receptor é altamente expresso no encéfalo, particularmente nos neurônios do córtex, hipocampo e cerebelo (Dixon e Gubitza, 1996; Mahan et al., 1991). Quanto a sua localização na membrana celular, o receptor A1 é encontrado nos terminais pré e pós-sinápticos (Rebola et al., 2003). O receptor A1 modula a atividade neuronal por meio do bloqueio da liberação de neurotransmissores e da redução da taxa de disparo neuronal. A ativação de receptores A1 pré-sinápticos localizados em terminais nervosos excitatórios bloqueia o influxo de íons cálcio, resultando na inibição da liberação do neurotransmissor. Além disso, receptores A1 pós-sinápticos

reforçam a eficiência desse sistema inibitório. Quando ativados, receptores A1 pós-sinápticos promovem aumento da condutância da membrana neuronal aos íons potássio, o que leva a diminuição da taxa de disparo neuronal e contribui para a inibição da transmissão sináptica (Brambilla et al., 2005). No estriado, os receptores A1 interagem com os receptores de dopamina do subtipo D1 nos neurônios MSN (do inglês, *medium spiny neurons* – MSN) da via nigro-estriatal (Ferré et al., 1996). Nesses neurônios, o receptor de dopamina D1 atua facilitando a neurotransmissão GABAérgica e a ativação do receptor A1 inibe essa facilitação (Florán et al., 2002). Portanto, esse controle da liberação de GABA dependente do receptor D1 é outra maneira pela qual o receptor A1 influencia a atividade neuronal. No encéfalo, o receptor A2A é encontrado predominantemente nos neurônios pós-sinápticos do estriado, mas também é encontrado – ainda que em número significativamente menor – nos terminais pré-sinápticos dos terminais córtico-estriatais e no hipocampo (Rebola et al., 2005) (Figura 4). O receptor A2A também forma heterodímeros com outros receptores acoplados à proteína G. Nos neurônios GABAérgicos do estriado, o receptor A2A se apresenta co-localizado com receptores de dopamina do subtipo D2. No estriado, o receptor A2A atua inibindo a ligação ao receptor de dopamina D2 (Schwarzschild et al., 2006). O receptor A2A também forma heterodímeros com o receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGlu5). Evidências indicam que os agonistas dos receptores A2A e os agonistas dos receptores mGlu5 podem sinergicamente reduzir a afinidade dos receptores D2 pelos seus agonistas nas membranas estriatais (Ferré et al., 1999; Popoli et al., 2001).

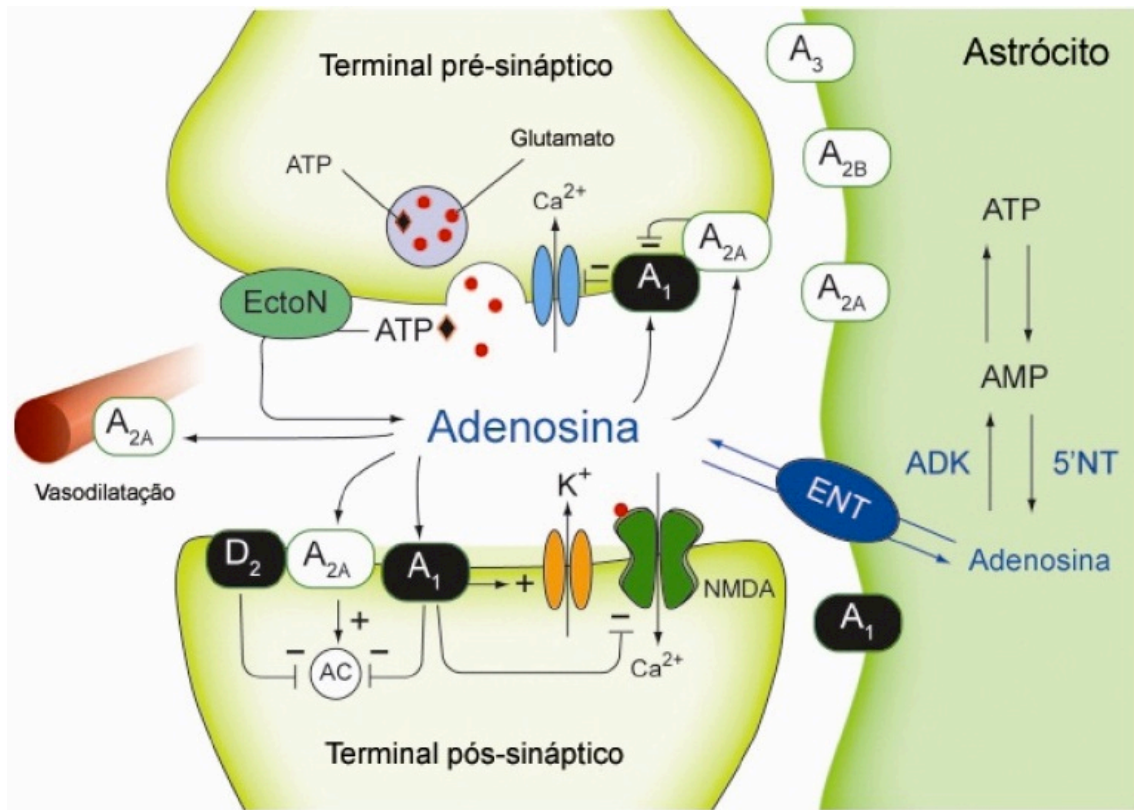


Figura 4. Principais características da sinalização adenosinérgica no SNC representadas em uma versão simplificada de uma sinapse. As duas principais fontes de adenosina extracelular são o transporte via transportador equilibrativo de nucleosídeo (ENT) e a conversão extracelular da adenosina trifosfato (ATP) pela ação das ectonucleotidasas (EctoN). Os receptores A₁ e A_{2A} são os principais mediadores dos efeitos encefálicos da adenosina. Os receptores A₁ inibem a adenilato ciclase (AC), aumentam a condutância aos íons potássio (K⁺) e inibem os canais de cálcio (Ca²⁺) pré-sinápticos. Esses receptores inibem a liberação de glutamato e as respostas pré-sinápticas mediadas pelos receptores N-metil-D aspartato (NMDA). Os receptores A_{2A} estimulam a AC e podem formar complexos de receptores heteroméricos com os receptores A₁ ou com os receptores de dopamina D₂ e antagonizar os efeitos da dopamina em neurônios estriado-palidais. Os receptores A_{2A} pré-sinápticos antagonizam os efeitos inibitórios dos receptores A₁ sobre a liberação de glutamato. Os receptores A_{2A} também estão presentes nos vasos sanguíneos e medeiam o efeito vasodilatador da adenosina no encéfalo e na periferia. ADK = adenosina cinase; AMP = adenosina monofosfato; 5'NT = 5'nucleotidase (adaptado de Benarroch, 2008).

I.2.2 ADENOSINA E CONDIÇÕES PATOLÓGICAS

Em situações de isquemia, hipóxia, excitotoxicidade ou inflamação, os níveis de adenosina aumentam, sendo o efeito desse aumento – sob essas condições – neuroprotetor (Ongini et al., 1997; Pedata et al., 2001; Cunha, 2001; Ribeiro et al., 2002; Schwarzschild et al., 2002; Fredholm et al., 2003). No entanto, provavelmente atuando via receptores do subtipo A2A, a adenosina também pode provocar neurotoxicidade, dano neural e morte celular (de Mendonça et al., 2000). Estudos utilizando animais transgênicos com aumentada expressão de receptores de adenosina do subtipo A2A apresentaram pior desempenho em testes de memória e aprendizado, quando comparados aos animais sem alteração na expressão de A2A (Giménez-Llort et al., 2007). A ativação dos receptores A2A com CGS 21680 (um agonista dos receptores A2A) promoveu o comprometimento do desempenho de camundongos nas tarefas de reconhecimento do objeto novo, esQUIVA inibitória e labirinto em Y (Pagnussat et al., 2015). Em um estudo de Li e colaboradores (Li et al., 2015), foi desenvolvida uma proteína quimérica rodopsina-A2AR (optoA2AR), o que permitiu, pela primeira vez, um controle optogenético da sinalização do A2A. Nesse estudo, a ativação optogenética da sinalização do receptor A2A no hipocampo foi suficiente para comprometer a memória de referencia espacial no teste de labirinto em Y. Ainda, em camundongos transgênicos portadores da mutação no gene codificador da APP – um modelo animal de DA – foram encontrados níveis significativamente elevados de receptores do subtipo A2A (Arendash et al., 2006). De acordo com essas observações, a administração de antagonistas seletivos A2A melhorou o desempenho de roedores em tarefas envolvendo memória de reconhecimento (Prediger et al., 2005), bem como a inativação genética dos receptores A2A aumentou a memória de reconhecimento espacial de camundongos (Wang et al., 2006).

A análise *post mortem* do encéfalo de pacientes diagnosticados com DA indicou perda dos receptores A1, especialmente nas camadas externas do giro denteado do hipocampo, região do encéfalo envolvida nos processos de aprendizado e memória (Jansen et al., 1990 and Ulas et al., 1993). Curiosamente, não foi encontrada perda dos receptores A1 nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, apesar de ter sido observada perda celular e degeneração (Jaarsma et al. 1991). Em contrapartida, foi encontrado um aumento dos receptores A1 e A2A no córtex frontal (Albasanz et al., 2008). Um fascinante estudo *post mortem* do tecido neocortical e do tecido hipocampal de pacientes portadores da DA (Angulo et al., 2003) encontrou uma significativa co-localização dos receptores A1 com A β nas placas senis. Ainda, esse estudo demonstrou que, em células humanas de neuroblastoma, a ativação do receptor A1 ativou a proteína cinase C (PKC), a proteína p21 Ras e as cinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), levando a um aumento da formação de fragmentos solúveis do A β . Além disso, agonistas dos receptores A1 dificultam a formação do aprendizado e a formação de memória em roedores, enquanto o bloqueio dos receptores de adenosina facilita o aprendizado e a formação de memória desses animais em testes de esquiva passiva (Maemoto et al., 2004; Normile e Barraco, 1991).

I.3 METABOLISMO DA CAFEÍNA

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcalóide pertencente ao grupo das xantinas e o psicoestimulante mais consumido no mundo, sendo a maior parte da cafeína consumida proveniente de fontes alimentares como café, chá e chocolate. A absorção da cafeína ocorre rapidamente em humanos, chegando a 99% de absorção 45 minutos após a ingestão. Após absorção, a cafeína sofre metabolismo de primeira

passagem pouco significativo, conforme indicado pela similaridade entre as curvas de concentração plasmática após administração oral e endovenosa em humanos e ratos (Devoe et al., 1993). A propriedade hidrofóbica da cafeína permite que essa molécula tenha passagem facilitada por todas as membranas biológicas, não havendo restrição de acesso ao SNC pela barreira hematoencefálica (Lachance et al., 1983; Tanaka et al., 1984). O metabolismo da cafeína ocorre predominantemente no fígado. O sistema enzimático microsomal hepático catalisa a biotransformação da cafeína em seus metabólitos paraxantina, teofilina e teobromina (Arnaud, 1987). Em roedores, a paraxantina é o principal metabólito da cafeína, embora a teofilina também seja encontrada em concentrações elevadas (Bonati et al., 1984-1985; Fredholm et al., 1999).

A meia-vida da cafeína é muito menor em ratos (42-90 minutos) do que em humanos (150-270 minutos) (Morgan et al., 1982). Por essa razão, em estudos utilizando ratos há correção da dose administrada para critério de comparação com humanos. Assume-se que 10 mg/kg de cafeína em um rato equivale a 250 mg de cafeína em um adulto pesando 70 kg (i.e. 3,5 mg/kg), o que corresponde a quantidade de cafeína presente em duas a três xícaras de 30 ml de café espresso (Fredholm et al., 1999).

I.3.1 MECANISMO DE AÇÃO DA CAFEÍNA NO SNC

Os efeitos da cafeína podem ser mediados por diferentes mecanismos: (1) antagonismo dos receptores A1 e A2A, (2) inibição das fosfodiesterases, (3) liberação do cálcio intracelular e (4) bloqueio dos receptores GABA_A. Entretanto, em doses usualmente consumidas, o antagonismo dos receptores A1 e A2A é o principal mecanismo pelo qual a cafeína exerce seus efeitos (Fredholm et al., 1999) (Figura 5).

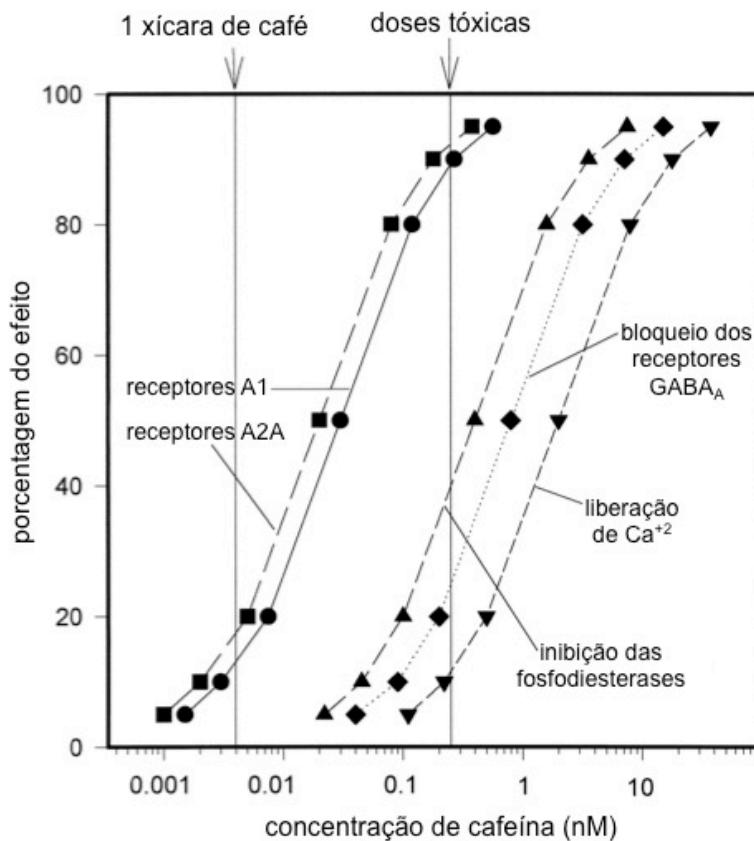


Figura 5. Efeito da cafeína em diferentes alvos bioquímicos em relação à concentração em humanos. Em concentrações obtidas após a ingestão de uma única xícara de café, a cafeína já é capaz de bloquear os efeitos da adenosina nos receptores A2A e nos receptores A1. Para inibir a hidrólise do cAMP por meio da inibição das fosfodiesterases, é necessária uma concentração 20 vezes maior. Para bloquear os receptores GABA_A, é necessária uma concentração 40 vezes maior. Para mobilizar a liberação de cálcio intracelular, é necessária uma concentração 100 vezes maior. Portanto, após o consumo de doses não tóxicas de cafeína, o antagonismo dos receptores A1 e A2A é o único mecanismo pelo qual a cafeína exerce seus efeitos. (adaptado de Fredholm et al., 1999).

O antagonismo exercido pela cafeína sobre os receptores de adenosina A1 e A2A é o mecanismo pelo qual a cafeína promove seus efeitos estimulantes no SNC. As concentrações plasmáticas de cafeína obtidas após uma única xícara de café ou chá variam de 1 a 10 µM e são suficientes para promover bloqueio significativo desses

receptores (Fredholm et al., 1999). Uma vez que a adenosina, via receptores A1, desempenha papel inibitório sobre a neurotransmissão dopaminérgica, colinérgica e glutamatérgica (Flagmeyer et al., 1997; Golembiowska e Zylewska, 1997; Okada et al., 1996; Wood et al., 1989) e a neurotransmissão dopaminérgica tem papel na determinação do estado de alerta, o efeito psicoestimulante da cafeína foi muito relacionado ao antagonismo dos receptores A1. Como existe uma interação entre os receptores A2A e os receptores dopaminérgicos D2 no estriado, essa interação ajuda a explicar o efeito da cafeína sobre a locomoção, pois ao bloquear o efeito modulatório negativo dos receptores A2A sobre os receptores dopaminérgicos D2, a cafeína permite a potenciação da neurotransmissão dopaminérgica (Ferré et al., 1997).

1.3.2 CAFEÍNA E DOENÇA DE ALZHEIMER

A ideia de que a cafeína pode ser empregada na prevenção de patologias associadas ao comprometimento cognitivo é suportada por pelo menos seis estudos longitudinais que demonstram uma relação inversa entre consumo de cafeína e o comprometimento da memória associado ao envelhecimento e à Doença de Alzheimer (Hameleers et al., 2000; Lindsay et al., 2002; van Boxtel et al., 2003; Ritchie et al., 2007; van Gelder et al., 2007; Eskelinen et al., 2009; Gelber et al., 2011). O efeito benéfico da cafeína na DA também é suportado por estudos em roedores. O tratamento com cafeína na água de beber durante 12 dias associado a uma única injeção intraperitoneal de cafeína 30 minutos antes da administração i.c.v. do peptídeo A β preveniu o comprometimento da memória nas tarefas de esquiwa inibitória e labirinto em Y (Dall'Igna et al., 2007). O efeito benéfico da cafeína sobre a memória também já foi observado em roedores idosos (Prediger et al., 2005; Costa et al., 2008; Leite et al., 2011; Vila-Luna et al., 2012; Arendash et al., 2009).

Particularmente, estudos utilizando camundongos transgênicos com mutação no gene codificador da APP (APP^{Sw}, Swedish mutation) – um modelo animal de DA – observaram que a administração crônica de uma dose diária de 1.5 mg de cafeína (equivalente a 500 mg em humanos) reduziu os níveis de A β encefálicos e protegeu contra déficits de memória (Arendash et al., 2006; Cao et al., 2009). Em camundongos, a cafeína e antagonistas dos receptores de adenosina preveniram o acúmulo do peptídeo β -amiloide dentro e ao redor dos vasos sanguíneos cerebrais – condição que, se não tratada, resulta em déficit cognitivo (Cupino e Zabel, 2013; Gahr et al., 2013).

É importante salientar que o efeito benéfico da cafeína sobre a memória e o potencial efeito neuroprotetor obtido pelo o consumo regular de cafeína têm sido atribuído ao antagonismo dos receptores A2A (Cunha e Agostinho, 2010; Ferré, 2008; Fredholm et al., 2005). Dessa forma, o antagonismo dos receptores A2A mimetiza o efeito da cafeína sobre a preservação da memória, conforme observado por estudos utilizando roedores idosos (Prediger et al., 2005; Leite et al., 2011) e modelos animais de DA (Canas et al., 2009; Dall'Igna et al., 2007; Cunha et al., 2008). De bastante relevância, um estudo recente demonstrou que a deleção genética dos receptores A2A ou a administração oral de antagonistas A2A promoveu proteção em camundongos THY-Tau22 (Laurent et al., 2014). Esses camundongos apresentam hiperfosforilação da proteína tau e, nesse estudo, a manipulação do receptor A2A resultou em proteção contra o comprometimento da memória espacial, além de promover a plasticidade hipocampal e redução da hiperfosforilação da proteína tau.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Proporcionar evidências sobre a eficácia da cafeína – um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina – no controle do déficit de memória associado à DA induzida pelo comprometimento da sinalização da insulina no encéfalo.

Objetivos específicos:

1. Reproduzir o modelo de DA induzida pela administração i.c.v. de STZ.
2. Avaliar o déficit mnemônico de ratos com DA induzida pela administração i.c.v. de STZ.
3. Avaliar a reatividade do marcador neuronal NeuN no hipocampo para testar a hipótese de que o comprometimento da memória do modelo vem acompanhado de perda neuronal.
4. Determinar o efeito da cafeína sobre a reatividade do marcador neuronal NeuN no hipocampo de ratos controles e ratos com DA induzida pela administração i.c.v de STZ
5. Determinar o efeito da cafeína sobre a memória de reconhecimento e o imunoconteúdo e a expressão dos receptores de adenosina A1 e A2A no hipocampo de ratos com DA induzida pela administração i.c.v de STZ.

PARTE II

CAPÍTULO I

Caffeine Consumption Prevents Memory Impairment, Neuronal Damage, and Adenosine A2A Receptors Upregulation in the Hippocampus of a Rat Model of Sporadic Dementia

Artigo publicado no periódico Journal of Alzheimer's Disease

Caffeine Consumption Prevents Memory Impairment, Neuronal Damage, and Adenosine A_{2A} Receptors Upregulation in the Hippocampus of a Rat Model of Sporadic Dementia

Janaína Espinosa^a, Andreia Rocha^a, Fernanda Nunes^a, Marcelo S. Costa^a, Vanessa Schein^a, Vanessa Kazlauckas^a, Eduardo Kalinine^a, Diogo O. Souza^a, Rodrigo A. Cunha^{b,c} and Lisiane O. Porciúncula^{a,*}

^aLaboratory of Studies on the Purinergic System, Federal University of Rio Grande do Sul, Health and Basic Sciences Institute, Department of Biochemistry, Porto Alegre/RS, Brazil

^bCNC-Center for Neurosciences and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

^cFMUC-Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.

Handling Associate Editor: Alexandre de Mendonça

Accepted 19 November 2012

Abstract. Intracerebroventricular (icv) streptozotocin (STZ) administration induces pathological and behavioral alterations similar to those observed in Alzheimer's disease (AD) and is thus considered an experimental model of sporadic AD. Since caffeine (an adenosine receptor antagonist) and selective antagonists of adenosine A_{2A} receptors modify the course of memory impairment in different amyloid- β -based experimental models of AD, we now tested the impact of caffeine on STZ-induced dementia and associated neurodegeneration in the hippocampus as well as on the expression and density of adenosine receptors. Adult male rats received a bilateral infusion of saline or STZ (3 mg/kg, icv), which triggered memory deficits after four weeks, as gauged by impaired object recognition memory. This was accompanied by a reduced NeuN immunoreactivity in the hippocampal CA1 region and an increased expression and density of adenosine A_{2A} receptors (A_{2A}AR), but not A_{1R}, in the hippocampus. Caffeine consumption (1 g/L in the drinking water starting 2 weeks before the STZ challenge) prevented the STZ-induced memory impairment and neurodegeneration as well as the upregulation of A_{2A}AR. These findings provide the first demonstration that caffeine prevents sporadic dementia and implicate the control of central A_{2A}AR as its likely mechanism of action.

Keywords: Adenosine receptors, Alzheimer's disease, caffeine, memory, streptozotocin

INTRODUCTION

Dementia is a generic term that describes chronic or progressive dysfunction of cortical and subcortical

function that results in complex cognitive decline. Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia in Western countries, accounting for more than half of cases [1]. A minor percentage of AD results from genetic-driven mutations, whereas the majority results from sporadic origins [2]. The molecular features of AD are benefited from the exploitation of transgenic mouse models of AD since they can mimic

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

specific aspects of AD pathogenesis, although no single line develop the progressive cognitive deficits, brain regional hypometabolism, plaques, tangles, and neuronal loss characteristic of the human disease [3]. However, these transgenic lines are expected to mimic features of familial forms of AD, rather than the prevalent situation of sporadic dementia, which has been proposed by intracerebroventricular (icv) administration of streptozotocin (STZ) [4–6]. In fact, the icv administration of STZ leads to an insulin insensitivity, selectively in the brain and not in the periphery [5, 7], together with changes in brain metabolism [8, 9], increased amyloidogenesis [10], tau hyperphosphorylation [11], limbic neuronal damage [12], and memory impairments [4, 12, 13], all features recapitulating sporadic dementia [2, 14].

Apart from understanding the etiology of dementia, it would be of uppermost importance to devise novel strategies to arrest the incidence of dementia. Epidemiological studies identified that the consumption of coffee, namely of caffeine, correlates inversely with the incidence or evolution of memory impairment upon aging or sporadic AD ([15–20], but also see [21]). This is in notable agreement with the conclusion from several different animal studies showing that chronic consumption of caffeine effectively counteracts memory impairment upon aging [22–24] or AD [25–27], as well as in different conditions such as diabetic neuropathy [28, 29], seizures [30], sleep deprivation [31], or chronic stress [32, 33]. The mechanisms underlying this ability of caffeine to prevent memory deterioration are still to be established, but the antagonism of adenosine receptors emerges as a prominent candidate since it is the only known molecular target of non-toxic doses of caffeine [34]. In particular, the antagonism of adenosine A_{2A} receptors, which are upregulated upon different brain insults [35], has been shown to mimic the beneficial impact of caffeine on memory impairment [36]. However, it is still unknown if caffeine can prevent memory impairment in an animal model of sporadic dementia and if this is accompanied by changes of the density of adenosine receptors.

Thus, we now took advantage of the ability of centrally injected STZ to cause progressive memory impairment without affecting the peripheral blood glucose level [7] to (i) explore its impact on the expression and on the density of adenosine receptors in the hippocampus; and (ii) to determine if caffeine consumption prevents memory impairment and neuronal viability loss in this experimental model of dementia.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Adult male Wistar rats (200–250 g) were maintained under a 12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 am), constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and with free access to food and water. All behavioral tests were performed between 8:00 am and 12:00 pm. All the experimental procedures were designed to minimize the number of animals used and their suffering and were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Rio Grande do Sul (Protocol no 2008223).

Stereotaxic surgery

Rats were anesthetized with ketamine (75 mg/kg, i.p.) and xylazine (10 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus. The lateral ventricles were bilaterally accessed (coordinates: 0.9 mm posterior to bregma; 1.5 mm lateral to sagittal suture; 3.6 mm beneath the surface of brain) and the rats received a single bilateral infusion of 5 μL STZ (3 mg/kg; from Sigma, São Paulo/Brazil) or vehicle (sodium chloride, 0.9% w/v). After the surgical procedure, rats were placed on a heating pad to maintain body temperature at $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ until recovery from anesthesia.

Caffeine treatment

Rats were allowed to consume *ad libitum* either drinking water or caffeinated drinking water at 1 g/L during two weeks prior to vehicle or STZ infusion. After surgery, caffeine consumption was maintained for 4 additional weeks. We have previously confirmed that this treatment regimen leads to a plasma concentration of 30 μM caffeine [37], which is thought to correspond to a moderate caffeine intake in humans, with meaningful effects believed to be restricted to adenosine receptors [38, 39].

Behavioral analysis

Open field

Four weeks after STZ or vehicle infusion, rats were submitted to the open field test to evaluate locomotion. The apparatus was made of black-painted Plexiglas measuring 50 \times 50 cm and was surrounded by 50 cm high walls. Each rat was placed in the center of the arena and the distance traveled was recorded during 5 min. The experiments were conducted in a sound-

attenuated room under low-intensity light (12 lux); activity was recorded with a video camera positioned above the arena and monitored in an adjacent room by an observer blind to the treatment of the animals. Locomotion was measured as the total distance traveled in meters calculated using a computer-operated tracking system (Any-maze, Stoelting, Woods Dale, IL).

Novel object recognition task

The object recognition test was carried out 24 h after habituation in the open field apparatus. Rats first underwent a training session, in which two identical objects were placed near the two corners at either end of one side of the chamber. Rats were placed individually into the open field facing the center of the opposite wall and allowed to explore the objects for 5 min. The test session was performed 90 min after training and two dissimilar objects were presented, a familiar one and a novel one [40]. Exploration was defined by directing the nose to the object at a distance of at least 2 cm and/or touching the object with the nose or forepaws. Rearing on to object was not considered exploratory behavior. The novel object recognition index was defined as: $TN/(TN + TF)$, [TN = time spent exploring the novel object; TF = time spent exploring familiar object] and was ranked manually by 2 observers blind to treatments.

Immunoblotting analysis of A₁ and A_{2A} receptor density

Twenty-four hours after the behavioral tests, the rats were killed by cervical displacement; the hippocampi were dissected out and immediately homogenized in a 5% SDS solution containing a protease inhibitor cocktail (Sigma, São Paulo/SP, Brazil) and frozen at -70°C . After defrost, the protein content was determined using the bicinchoninic acid assay (Pierce, São Paulo/Brazil). Sample extracts were diluted to a final protein concentration of $2\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ in SDS-PAGE buffer and SDS-PAGE analysis was carried out with $30\ \mu\text{g}$ (for A₁R) or $40\ \mu\text{g}$ (for A_{2A}R) together with pre-stained molecular weight standards (Bio-Rad, São Paulo/Brazil) using a 12% gel with a 4% concentrating gel. After electro-transfer, the membranes were blocked with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 and 3% bovine serum albumin for 1 h. The nitrocellulose membranes (Amersham, São Paulo/Brazil) were then incubated overnight at 4°C with rabbit anti-A₁R antibody (1 : 10000; Affinity Bioreagents, USA) or goat anti-A_{2A}R antibody (1 : 5000; Santa Cruz Biotechnology, USA). The mem-

branes were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 2 h at room temperature and developed with chemiluminescence ECL kit (Amersham, São Paulo/Brazil). Densitometric analyses were performed using NIH ImageJ software. β -Tubulin was used as a loading control and was quantified using a mouse anti- β -tubulin antibody (1 : 1000; from Santa Cruz Biotechnologies, São Paulo/Brazil), as described above.

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

Twenty-four hours after behavioral tests, rats were killed by cervical displacement and the hippocampi were dissected out in sterile conditions, collected in RNase-free polypropylene tubes, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Total RNA was extracted with RNAqueous[®] Kit (Ambion Inc., USA) according to manufacturer's instructions. RNA integrity, purity, and concentration were checked by electrophoresis in 1% agarose gel and spectrophotometry. First strand cDNA was synthesized from $0.5\ \mu\text{g}$ of total RNA using SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen São Paulo/SP, Brazil). Each cDNA pool was then aliquoted and stored at -20°C .

Gene sequence information of *Adora2a* (NCBI reference sequence NP_445746.3) and *Adora1* (NCBI reference sequence NP_058851.2) was collected from databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> and <http://www.ensembl.org>). Specific primers for each gene were designed using the IDT Design Software (Integrated DNA Technologies Inc., USA) taking care to avoid primers that could generate secondary structures (primers and template). The primers for *Adora1* (forward: 5'-TCCGAGTCAAGATCCCTC TC-3'; reverse: 5'-GTCTTGCTCTACCACACTCAG-3') were designed between exons 1 and 2 and the primers for *Adora2a* (forward: 5'-TCTTCGCCTGTT TTGTCTCTG-3'; reverse: 5'-CCTCACACCTGTCA CCAAG-3') between exons 2 and 3. Two reference genes (*Tbp* and *Pgk1*) [41] were run as endogenous controls. All primer sequences were assessed for specificity using non-redundant basic local alignment search tools (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and target-specific sequence alignment programs.

The qPCR reactions were performed in triplicate on StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, São Paulo/SP, Brazil) containing $0.1\ \mu\text{M}$ of each specific primer, $0.5\ \text{ng}/\mu\text{L}$ cDNA and Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen, Biogen Porto Alegre/RS, Brazil). The following

thermal cycling conditions were used for qPCR: 2 min at 50°C, 2 min at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s. Under these conditions, qPCR produced a single sequence with a defined melting temperature for each gene analyzed. Control reactions were performed to verify that no amplification occurred without cDNA. The expression levels of all transcripts studied were normalized to the *Tbp* expression level and the relative changes in gene expression were calculated using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method, with samples from vehicle/water control group being used as the calibrator [42].

Immunohistochemistry

Twenty-four hours after the behavioral tests, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde. The brains were removed from skull and postfixed 4% paraformaldehyde solution at 4°C for 24 h and then sectioned (50 μ m thick) on a vibratome (Leica, São Paulo/SP, Brazil). The sections were then pre-incubated in 1% bovine serum albumin in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 40 min and incubated overnight at 4°C with mouse anti-NeuN antibody (1:500, Chemicon, São Paulo/SP, Brazil) in PBS. After rinsing five times in PBS, sections were incubated with anti-mouse secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 fluorescent dye (1:500, Invitrogen, Biogen Porto Alegre/RS, Brazil) in PBS for 2 h at room temperature. After staining, sections were washed in PBS, counterstained with 0.0001% DAPI (Invitrogen) for 10 min, and rinsed again. Coverslips were mounted using fluorescence mounting medium (Dako, São Paulo/Brazil). Images were acquired using an Olympus IX70 confocal microscope with the Fluoview software and the fluorescence intensities were measured in 540 \times 329 frames in hippocampal subareas using NIH ImageJ software.

Statistical analysis

Two-way ANOVA was used for statistical analysis of western blot, immunohistochemistry, and open field data. Three-way ANOVA was used for the novel object recognition, with trials as repeated measures, and treatments (drinking water or caffeine) versus infusion (vehicle or STZ) as factors. qPCR data were analyzed using DataAssist Software v3.01 (Applied Biosystems). This software calculates *p* values with a *t*-test using Benjamini-Hochberg false discovery rate

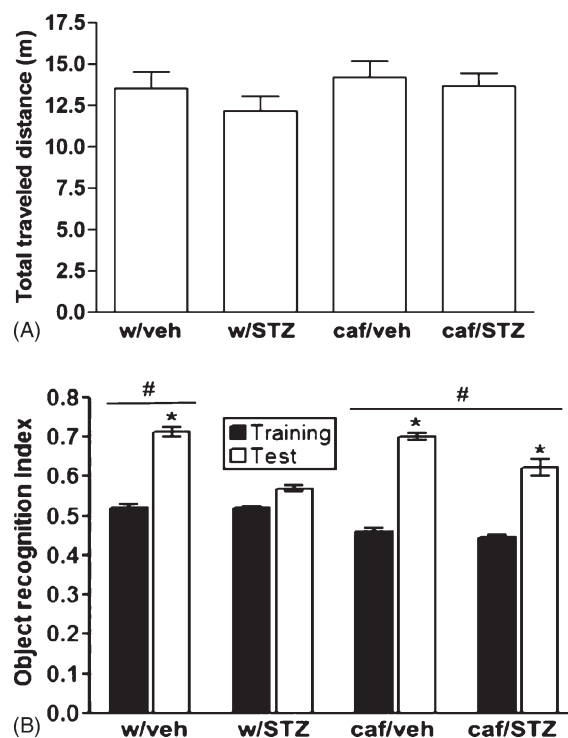


Fig. 1. Behavioral analysis of rats treated with caffeine (caf, 1 g/L) or drinking water (w) in the open field test (A) and in the object recognition test (B) performed 4 weeks after the icv infusion of vehicle (0.9% NaCl, veh) or STZ (3 mg/kg). Panel A shows the traveled distance in meters during 5 min of video recording in the open field, displayed as means + S.E.M. ($n = 10$ – 12 animals per group). No significant differences were found between groups. Panel B shows the object recognition index, displayed as means + S.E.M. ($n = 10$ – 12 animals per group). * $p < 0.05$, differences between training (black bars) and test (white bars) sessions. # $p < 0.05$ indicates differences compared to w/STZ group (three-way ANOVA).

[43]. Data were expressed as means \pm SEM and differences were considered statistically significant for $p < 0.05$.

RESULTS

Behavioral effects

Caffeine treatment for six weeks did not affect the locomotor activity of vehicle [$F(1,38) = 0.49$, $p = 0.4864$] or STZ-treated rats [$F(1,38) = 0.00$, $p = 0.9988$]. Thus, total distance traveled during the open field test was not significantly different between groups (Fig. 1A). Analysis of the time spent on both objects during novel object recognition test revealed only significant effect of trials [$F(1,38) = 9.14$, $p = 0.0045$], whereas the effect of treatment [$F(3,38) = 1.02$, $p = 0.3943$] and the interaction

between treatment and trials was not statistically significant [$F(3,38)=1.16$, $p=0.3368$]. Thus, all groups spent less time on the objects during test session. Three-way ANOVA with repeated measures comparing object recognition index reveals a significant effect of trials [$F(1,38)=46.195$, $p<0.001$] and there was a significant interaction between caffeine and STZ [$F(1,38)=4.491$, $p=0.041$], which means that caffeine prevented the STZ-induced deterioration of object recognition task performance. However, caffeine alone had no effect on object recognition performance when compared to control (drinking water) rats (Fig. 1B).

Immunohistochemistry for neuN

NeuN (neuronal nuclei antigen) is a marker of neurons and a decrease of its immunoreactivity was taken as an index of neuronal viability loss. Histological analysis revealed a significant reduction of NeuN fluorescence intensity in the hippocampal CA1 area of STZ-treated animals [$F(1,8)=28.84$, $p=0.0007$]. Notably, there was a significant interaction between caffeine and STZ [$F(1,8)=12.49$, $p=0.0077$], which means that caffeine prevented the STZ-induced neurodegeneration in the CA1 area (Fig. 2).

Western blot

STZ-induced an increase of the density of adenosine A_{2A} receptors (A_{2A}R) in the hippocampus which was prevented by caffeine consumption [$F(1,20)=4.83$, $p=0.0399$], whereas caffeine failed to affect the density of hippocampal A_{2A}R in vehicle-treated animals [$F(1,20)=2.59$, $p=0.1231$] (Fig. 3A). In contrast, the density of hippocampal A₁R was not modified by infusion of STZ [$F(1,20)=0.35$, $p=0.5613$] or caffeine consumption [$F(1,20)=0.04$, $p=0.8484$]; moreover, there was no interaction between STZ and caffeine in the control of A₁R density in the hippocampus [$F(1,20)=0.25$, $p=0.6237$] (Fig. 3B).

Modification of adenosine A_{2A} receptors mRNA expression

In accordance with the STZ-induced increased density of A_{2A}R protein, the expression of A_{2A}R mRNA, as determined by a relative quantification using the water/vehicle group as the calibrator, was higher in STZ-treated rats ($p=0.0473$); in contrast, there was no alteration of the A_{2A}R mRNA levels in the vehicle-treated groups in the absence or presence of

caffeine (Fig. 4). Also in agreement with the lack of modification of A₁R density, we found no modification of A₁R mRNA expression in any of the groups (Fig. 4 and Table 1).

DISCUSSION

The present study shows that the consumption of caffeine provides a prophylactic neuroprotection against memory impairment and neuronal damage caused by the icv administration of STZ, which has been widely used as a model of sporadic dementia [4–6]. This was based on the combined observations that caffeine prevented the icv-STZ-induced: 1) loss of immunoreactivity of a neuronal marker in the CA1 area of the hippocampus, which is compatible with the neuronal loss in the CA1 area reported to be present in AD patients [44]; 2) impairment of short-term memory evaluated using the object recognition memory test, precisely the memory domain more precociously affected in AD [14]. This is in notable agreement with the epidemiological evidence obtained in humans showing that the consumption of caffeine affords a prophylactic benefit to attenuate the memory deficits associated with aging and AD ([15–20] but also see [21]). The present study also extends to an animal model of sporadic dementia the same evidence previously obtained in animal models of AD disease based on the injection of amyloid- β peptides [26, 45] or the overproduction of amyloid- β peptides in transgenic models of AD [25, 26].

The mechanism underlying this ability of caffeine to prevent STZ-induced hippocampal neurodegeneration and memory impairment is still not established. Since previous studies have established that the icv administration of STZ selectively hampers the central insulin signaling without modification of the peripheral control of glucose metabolism [5, 7], it is likely that caffeine is acting centrally rather than peripherally to afford its neuroprotective benefit. One possibility would be that caffeine might directly prevent the central insulin deficiency caused by STZ, given that deficits in insulin signaling can cause memory deficits [46] and can trigger oxidative stress that could, at least in part, explain the hippocampal neurodegeneration [47, 48]. This hypothesis would fit in the reported ability of caffeine to control peripheral insulin insensitivity in conditions such as diabetes and/or obesity, albeit opposite effects have been reported in the literature [49–52], possibly as a result of the different impact of adenosine A₁ and adenosine A_{2B} receptors

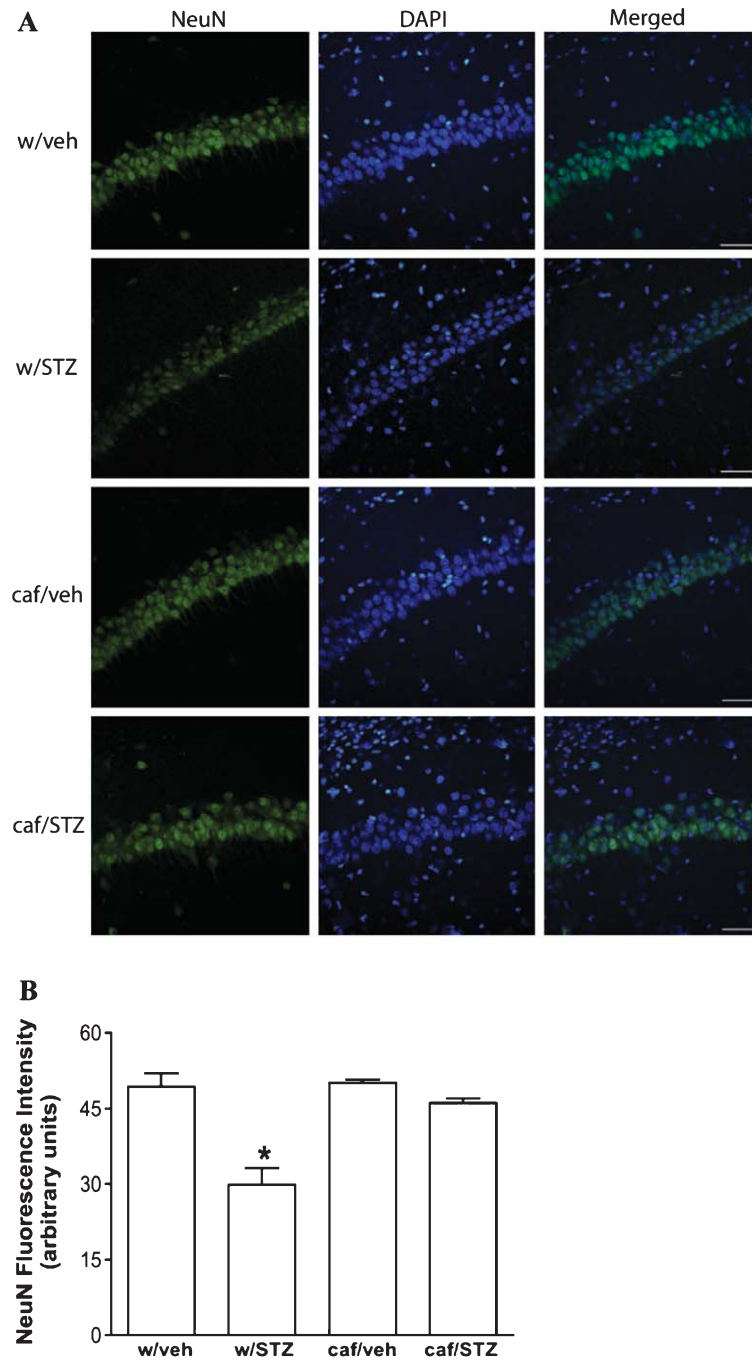


Fig. 2. Effects of caffeine (caf, 1 g/L) or drinking water (w) consumption on neurodegeneration in the CA1 area of the hippocampus of adult rats analyzed 4 weeks after the icv infusion of vehicle (0.9% NaCl, veh) or STZ (3 mg/kg). Panel A shows representative confocal images of NeuN (green) and DAPI (blue) immunohistochemical staining (40 × magnification). Scale bar, 50 μm. Panel B displays the average of NeuN fluorescence intensity (B), presented as means ± S.E.M ($n = 3$ animals per group). * $p < 0.05$, indicates difference from all other groups (two-way ANOVA).

on insulin sensitivity [53, 54] or on the parallel effects of caffeine on different factor controlling insulin sensitivity [55, 56]. However, the likeliness of this

hypothesis is somewhat dampened by the observation that caffeine consumption also affords a prophylactic benefit to prevent memory impairment in different

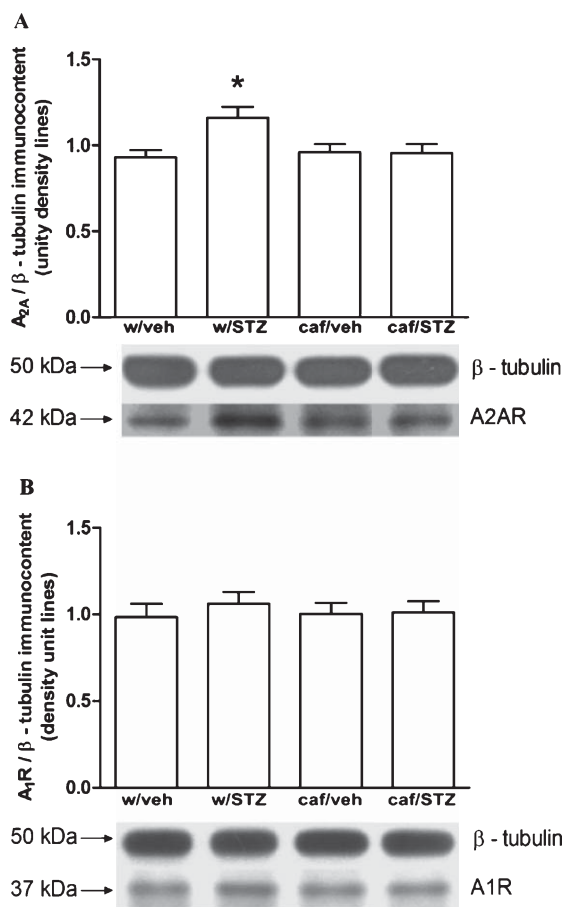


Fig. 3. Effects of caffeine (caf, 1 g/L) or drinking water (w) consumption on the density of hippocampal A₁ and A_{2A} receptors, 4 weeks after the icv infusion of saline (0.9%, veh) or STZ (3 mg/kg). Panels A and B display the immunocent (normalized by the β-tubulin immunoreactivity) of adenosine A_{2A} (A) and A₁ receptors (B) presented as means ± S.E.M (*n* = 5–7 animals per group). Representative western blot bands for A₁ and A_{2A} receptors, as well as β-tubulin immunoreactivity are displayed below each bar graph. **p* < 0.05, significant differences from all other groups (two-way ANOVA).

other conditions such as seizures [30], sleep deprivation [31], chronic repeated stress [32, 33], Parkinson's disease [57], attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) [58, 59], or scopolamine-induced amnesia [60]. Since the central insulin signaling system has not been shown to be a contributor to memory impairment in several of these experimental conditions, it is more likely that the main mechanism by which caffeine consumption prevents memory impairment might be independent of its putative ability to directly control central insulin signaling. Another major argument to dismiss this hypothesis is the observation that chronic caffeine mostly affects central adenosine A_{2A} receptors (A2AR) [35, 61], which do not seem

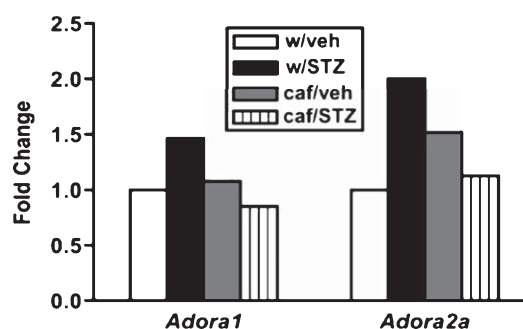


Fig. 4. Expression of hippocampal A₁ and A_{2A} receptor mRNA in the hippocampus of rats treated with caffeine (caf, 1 g/L) or drinking water (w) 4 weeks after the icv infusion of saline (0.9%, control) or STZ (3 mg/kg). Values are expressed as fold change (log₂) compared to control veh/w. The DataAssist software was used to find statistical significance among the differentially expressed genes, which quantifications and expression are presented in Table 1.

Table 1

Statistical analysis of the effects of caffeine (caf, 1 g/L) or drinking water (w) consumption on the expression of hippocampal A₁ and A_{2A} receptor mRNA, 4 weeks after the icv infusion of saline (0.9%, veh) or STZ (3 mg/kg). The relative expression in each group was indicated by the fold change relative to the median of control rats (injected with vehicle and drinking water). *Significant fold-change difference in expression after adjustment for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method

Group	Adora1		Adora2a	
	Fold change (RQ)	P-value	Fold change (RQ)	P-value
w/STZ	1.466	0.1575	2.003	0.0473*
caf/veh	1.0787	0.7539	1.5179	0.3138
caf/STZ	0.8552	0.5411	1.1277	0.7702

to be involved in the control of insulin sensitivity [62, 63]; furthermore, it has been shown that antagonists of A2AR mimic caffeine-associated neuroprotection (reviewed in [35]) and prevention of memory loss both in animal models of AD [26, 45, 64] as well as in other conditions resulting in memory deficits [22, 30, 58].

This putative key involvement of A2AR in memory dysfunction is further reinforced by the present study. In fact, one of the striking observations of this study was the increased expression and density of A2AR after icv administration of STZ and the ability of caffeine to prevent both STZ-induced upregulation of A2AR, neurodegeneration, and memory impairment. This upregulation of the density of neuronal A2AR, rather than of A1R, is reported to be present in different conditions where memory impairment is observed such as seizures [30], diabetes [28, 29, 65], ADHD [59], or chronic stress [66] and has also been reported to occur both in animal models of AD [25] and in necropsic cortical tissue of AD patients [67]. Notably,

as was now observed in this model of sporadic dementia, the chronic consumption of caffeine displays a parallel ability to control both memory impairment as well as the upregulation of A_{2A}AR. Therefore, in spite of being purely correlative in nature, this consistent observation that A_{2A}AR are upregulated in conditions associated with memory impairment, together with the benefits afforded by A_{2A}AR antagonists, strongly implicate A_{2A}AR upregulation as a key event in the establishment of neurodegeneration and memory deficits after brain insults. The definition of a causal relation between A_{2A}AR upregulation and the incidence of neurodegeneration and memory impairment will probably require the clarification of the signaling and molecular mechanisms linking brain stressful conditions to the upregulation of A_{2A}AR, which are still not understood. Accordingly, recent report showed that albeit the blockade of A_{2A}AR reversed learning-induced deficits by chronic stress, A_{2A}AR remained upregulated in the hippocampus [68]. Finally, it is worth noting that this upregulation of A_{2A}AR upon brain insults, namely upon icv administration of STZ, allows understanding why caffeine effectively affects animals with memory deficits (where A_{2A}AR are upregulated) and fails to modify memory performance in control animals (where A_{2A}AR are not upregulated).

In summary, the present study provides the first demonstration that caffeine simultaneously prevented memory deterioration and neurodegeneration in parallel with a control of the increased density of A_{2A}AR in an icv-STZ-based rat model of sporadic AD. This reinforces the particular ability of caffeine to prevent memory impairment associated with AD both in animal models as well as in humans and underscores the importance of the aberrant up-regulation of A_{2A}AR as a possible etiological factor associated with AD.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by PRONEX FAPERGS/CNPq (PRONEM Proc n° 11/2032-5), CAPES/FCT and INCT-EN. RAC thanks the financial support of FCT and *Science Without Borders* program from Brazil (CNPq/CAPES).

Authors' disclosures available online (<http://www.j-alz.com/disclosures/view.php?id=1579>).

REFERENCES

- [1] Ritchie K, Lovestone S (2002) The dementias. *Lancet* **360**, 1759-1766.
- [2] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* **368**, 387-403.
- [3] Ashe KH, Zahs KR (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* **66**, 631-645.
- [4] Lannert H, Hoyer S (1998) Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci* **112**, 1199-1208.
- [5] de la Monte SM, Tong M, Lester-Coll N, Plater M Jr, Wands JR (2006) Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: Relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **10**, 89-109.
- [6] Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Grunblatt E, Riederer P, Hoyer S (2009) Modeling sporadic Alzheimer's disease: The insulin resistant brain state generates multiple long-term morphobiological abnormalities including hyperphosphorylated tau protein and amyloid-beta. *J Alzheimers Dis* **18**, 729-750.
- [7] Mayer G, Nitsch R, Hoyer S (1990) Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res* **532**, 95-100.
- [8] Duelli R, Schrock H, Kuschinsky W, Hoyer S (1994) Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci* **12**, 737-743.
- [9] Heo JH, Lee SR, Lee ST, Lee KM, Oh JH, Jang DP, Chang KT, Cho ZH (2011) Spatial distribution of glucose hypometabolism induced by intracerebroventricular streptozotocin in monkeys. *J Alzheimers Dis* **25**, 517-523.
- [10] Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Bruckner MK, Hoyer S, Arendt T, Riederer P (2011) Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: A long-term follow up study. *J Neural Transm* **118**, 765-772.
- [11] Grunblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S (2007) Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem* **101**, 757-770.
- [12] Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Weinstock M (2003) Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol* **184**, 1043-1052.
- [13] Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M (2007) Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology* **52**, 836-843.
- [14] Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-766.
- [15] Maia L, de Mendonca A (2002) Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol* **9**, 377-382.
- [16] Ritchie K, Carriere I, de Mendonca A, Portet F, Dartigues JF, Rouaud O, Barberger-Gateau P, Ancelin ML (2007) The neuroprotective effects of caffeine: A prospective population study (the Three City Study). *Neurology* **69**, 536-545.
- [17] Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M (2009) Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: A population-based CAIDE study. *J Alzheimers Dis* **16**, 85-91.
- [18] Smith AP (2009) Caffeine, cognitive failures and health in a non-working community sample. *Hum Psychopharmacol* **24**, 29-34.
- [19] Santos C, Lunet N, Azevedo A, de Mendonca A, Ritchie K, Barros H (2010) Caffeine intake is associated with a lower

- risk of cognitive decline: A cohort study from Portugal. *J Alzheimers Dis* **20**(Suppl 1), S175-S185.
- [20] Gelber RP, Petrovitch H, Masaki KH, Ross GW, White LR (2011) Coffee intake in midlife and risk of dementia and its neuropathologic correlates. *J Alzheimers Dis* **23**, 607-615.
- [21] Laitala VS, Kaprio J, Koskenvuo M, Raiha I, Rinne JO, Silventoinen K (2009) Coffee drinking in middle age is not associated with cognitive performance in old age. *Am J Clin Nutr* **90**, 640-646.
- [22] Prediger RD, Batista LC, Takahashi RN (2005) Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol Aging* **26**, 957-964.
- [23] Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Souza DO, Porciuncula LO (2008) Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience* **153**, 1071-1078.
- [24] Sallaberry C, Nunes F, Costa MS, Fioreze GT, Ardais AP, Botton PH, Klaudat B, Forte T, Souza DO, Elisabetsky E, Porciuncula LO (2013) Chronic caffeine prevents changes in inhibitory avoidance memory and hippocampal BDNF immunoccontent in middle-aged rats. *Neuropharmacology* **64**, 153-159.
- [25] Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, Shippy D, Tan J (2006) Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* **142**, 941-952.
- [26] Arendash GW, Mori T, Cao C, Mamcarz M, Runfeldt M, Dickson A, Rezai-Zadeh K, Tane J, Citron BA, Lin X, Echeverria V, Potter H (2009) Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. *J Alzheimers Dis* **17**, 661-680.
- [27] Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR (2007) Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol* **203**, 241-245.
- [28] Duarte JM, Carvalho RA, Cunha RA, Gruetter R (2009) Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurochem* **111**, 368-379.
- [29] Duarte JM, Agostinho PM, Carvalho RA, Cunha RA (2012) Caffeine consumption prevents diabetes-induced memory impairment and synaptotoxicity in the hippocampus of NON-cZNO10/LTJ mice. *PLoS One* **7**, e21899.
- [30] Cognato GP, Agostinho PM, Hockemeyer J, Muller CE, Souza DO, Cunha RA (2010) Caffeine and an adenosine A(2A) receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. *J Neurochem* **112**, 453-462.
- [31] Alhaider IA, Aleisa AM, Tran TT, Alzoubi KH, Alkadhi KA (2010) Chronic caffeine treatment prevents sleep deprivation-induced impairment of cognitive function and synaptic plasticity. *Sleep* **33**, 437-444.
- [32] Lieberman HR, Tharion WJ, Shukitt-Hale B, Speckman KL, Tulley R (2002) Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S Navy SEAL training. Sea-Air-Land. *Psychopharmacology (Berl)* **164**, 250-261.
- [33] Alzoubi KH, Abdul-Razzak KK, Khabour OF, Al-Tuweiq GM, Alzubi MA, Alkadhi KA (2013) Caffeine prevents cognitive impairment induced by chronic psychosocial stress and/or high fat-high carbohydrate diet. *Behav Brain Res* **237**, 7-14.
- [34] Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM (2005) Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* **63**, 191-270.
- [35] Cunha RA (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. *Purinergic Signal* **1**, 111-134.
- [36] Cunha RA, Agostinho PM (2010) Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J Alzheimers Dis* **20**(Suppl 1), S95-s116.
- [37] Costenla AR, Cunha RA, de Mendonca A (2010) Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. *J Alzheimers Dis* **20**(Suppl 1), S25-S34.
- [38] Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* **51**, 83-133.
- [39] Quarta D, Ferre S, Solinas M, You ZB, Hockemeyer J, Popoli P, Goldberg SR (2004) Opposite modulatory roles for adenosine A1 and A2A receptors on glutamate and dopamine release in the shell of the nucleus accumbens Effects of chronic caffeine exposure. *J Neurochem* **88**, 1151-1158.
- [40] Bevins RA, Besheer J (2006) Object recognition in rats and mice: A one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* **1**, 1306-1311.
- [41] Santos AR, Duarte CB (2008) Validation of internal control genes for expression studies: Effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **86**, 3684-3692.
- [42] Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**, 1101-1108.
- [43] Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc Ser B* **57**, 289-300.
- [44] Gemmell E, Bosomworth H, Allan L, Hall R, Khundakar A, Oakley AE, Deramecourt V, Polvikoski TM, O'Brien JT, Kalaria RN (2012) Hippocampal neuronal atrophy and cognitive function in delayed poststroke and aging-related dementias. *Stroke* **43**, 808-814.
- [45] Cunha GM, Canas PM, Melo CS, Hockemeyer J, Muller CE, Oliveira CR, Cunha RA (2008) Adenosine A2A receptor blockade prevents memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Exp Neurol* **210**, 776-781.
- [46] Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, Alkon DL (2004) Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol* **490**, 71-81.
- [47] Hoyer S, Lannert H (2007) Long-term abnormalities in brain glucose/energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: Implication of tau-protein. *J Neural Transm Suppl* **72**, 195-202.
- [48] Saxena G, Patro IK, Nath C (2011) ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: A protective role of nicotinic receptor. *Behav Brain Res* **224**, 50-57.
- [49] Park S, Jang JS, Hong SM (2007) Long-term consumption of caffeine improves glucose homeostasis by enhancing insulinotropic action through islet insulin/insulin-like growth factor 1 signaling in diabetic rats. *Metabolism* **56**, 599-607.
- [50] Egawa T, Tsuda S, Ma X, Hamada T, Hayashi T (2011) Caffeine modulates phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs insulin signal transduction in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* **111**, 1629-1636.
- [51] Loopstra-Masters RC, Liese AD, Haffner SM, Wagenknecht LE, Hanley AJ (2011) Associations between the intake of

- caffeinated and decaffeinated coffee and measures of insulin sensitivity and beta cell function. *Diabetologia* **54**, 320-328.
- [52] Hatonen KA, Virtamo J, Eriksson JG, Sinkko HK, Erlund I, Jousilahti P, Leiviska JM, Valsta LM (2012) Coffee does not modify postprandial glycaemic and insulinaemic responses induced by carbohydrates. *Eur J Nutr* **51**, 801-806.
- [53] Faulhaber-Walter R, Jou W, Mizel D, Li L, Zhang J, Kim SM, Huang Y, Chen M, Briggs JP, Gavrilova O, Schnermann JB (2011) Impaired glucose tolerance in the absence of adenosine A1 receptor signaling. *Diabetes* **60**, 2578-2587.
- [54] Johnston-Cox H, Koupenova M, Yang D, Corkey B, Gokce N, Farb MG, LeBrasseur N, Ravid K (2012) The A2b adenosine receptor modulates glucose homeostasis and obesity. *PLoS One* **7**, e40584.
- [55] Salehi A, Parandeh F, Fredholm BB, Grapengiesser E, Hellman B (2009) Absence of adenosine A1 receptors unmasks pulses of insulin release and prolongs those of glucagon and somatostatin. *Life Sci* **85**, 470-476.
- [56] Conde SV, Nunes da Silva T, Gonzalez C, MotaCarmo M, Monteiro EC, Guarino MP (2012) Chronic caffeine intake decreases circulating catecholamines and prevents diet-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Br J Nutr* **107**, 86-95.
- [57] Gevaerd MS, Takahashi RN, Silveira R, Da Cunha C (2001) Caffeine reverses the memory disruption induced by intranigral MPTP-injection in rats. *Brain Res Bull* **55**, 101-106.
- [58] Prediger RD, Pamplona FA, Fernandes D, Takahashi RN (2005) Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) – the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Int J Neuropsychopharmacol* **8**, 583-594.
- [59] Pandolfo P, Machado NJ, Kofalvi A, Takahashi RN, Cunha RA (2012) Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*, doi:10.1016/j.euroneuro.2012.04.011
- [60] Botton PH, Costa MS, Ardais AP, Mioranza S, Souza DO, da Rocha JB, Porciuncula LO (2010) Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behav Brain Res* **214**, 254-259.
- [61] Ferre S (2008) An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem* **105**, 1067-1079.
- [62] Nemeth ZH, Bleich D, Csoka B, Pacher P, Mabley JG, Himer L, Vizi ES, Deitch EA, Szabo C, Cronstein BN, Hasko G (2007) Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes. *FASEB J* **21**, 2379-2388.
- [63] Maeda T, Koos BJ (2009) Adenosine A1 and A2a receptors modulate insulinemia, glycemia, and lactatemia in fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**, R693-R701.
- [64] Canas PM, Porciuncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, Oliveira CR, Cunha RA (2009) Adenosine A_{2A} receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* **29**, 14741-14751.
- [65] Duarte JM, Oliveira CR, Ambrosio AF, Cunha RA (2006) Modification of adenosine A1 and A2A receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochem Int* **48**, 144-150.
- [66] Cunha GM, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA (2006) Increased density and synapto-protective effect of adenosine A2A receptors upon sub-chronic restraint stress. *Neuroscience* **141**, 1775-1781.
- [67] Albasanz JL, Perez S, Barrachina M, Ferrer I, Martin M (2008) Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **18**, 211-219.
- [68] Batalha VL, Pego JM, Fontinha BM, Costenla AR, Valadas JS, Baqi Y, Radjainia H, Muller CE, Sebastiao AM, Lopes LV (2012) Adenosine A(2A) receptor blockade reverts hippocampal stress-induced deficits and restores corticosterone circadian oscillation. *Mol Psychiatry*, doi: 10.1038/mp.2012.8.

PARTE III

III. DISCUSSÃO

O presente estudo confirmou o comprometimento da memória resultante da administração i.c.v. da STZ utilizando a tarefa de reconhecimento do objeto novo. Nessa tarefa, optamos por avaliar somente a memória de curta duração, que é precisamente o tipo de memória mais afetada na DA (revisado por Selkoe, 2001). Além disso, o desempenho nessa tarefa se deteriora à medida que o período de tempo entre as sessões de treino e teste aumenta (Sik et al., 2003). Os ratos infundidos com STZ não apresentaram diferença significativa na distancia total percorrida na tarefa do campo aberto e, portanto, alterações na atividade locomotora não estão relacionadas ao déficit observado na tarefa de reconhecimento do objeto novo. O baixo desempenho na tarefa de reconhecimento do objeto reforça evidências prévias de que a infusão i.c.v. de STZ é um modelo relevante para o estudo da DA (Lannert e Hoyer, 1998; Steen et al., 2005; Lester-Coll et al., 2006; Salkovic-Petrisic et al., 2006; Grünblatt et al., 2007). O consumo de cafeína por um período de duas semanas antes da cirurgia, seguido por adicionais quatro semanas após a cirurgia, foi capaz de prevenir o comprometimento cognitivo decorrente da administração i.c.v. de STZ. Esse resultado vai ao encontro de evidências epidemiológicas de pelo menos seis estudos que demonstram uma relação inversa entre consumo de cafeína e o comprometimento da memória associado ao envelhecimento e à DA (Hameleers et al., 2000; Lindsay et al., 2002; van Boxtel et al., 2003; Ritchie et al., 2007; van Gelder et al., 2007; Eskelinen et al., 2009; Gelber et al., 2011). Além disso, o presente estudo apresenta evidências de que a cafeína também possui efeito benéfico sobre a memória no modelo de DA induzida por STZ. Até o momento, esse efeito havia sido investigado somente em modelos animais baseados na infusão de A β e camundongos transgênicos.

Utilizando o modelo de DA baseado no comprometimento da sinalização insulínica no encéfalo, demonstramos que o comprometimento cognitivo neste modelo vem acompanhado de diminuição na reatividade do marcador neuronal NeuN na região CA1 do hipocampo e aumento da densidade e expressão dos receptores de adenosina A2A no hipocampo, sem modificação dos receptores A1. Esse achado está de acordo com estudos prévios que investigaram as modificações na densidade dos receptores de adenosina no córtex de diferentes modelos animais caracterizados por comprometimento da memória (revisado em Cunha e Agostinho, 2010). De fato, no envelhecimento (Canas et al., 2009), diabetes tipo 1 (Duarte et al., 2009) e convulsões no início da vida (Cognato et al., 2010) há um comprometimento da memória e um desequilíbrio na densidade dos receptores de adenosina, particularmente do receptor A2A. Do ponto de vista translacional, a relevância do modelo de DA induzida por STZ i.c.v. e dos receptores A2A na DA é corroborada por um estudo recente que encontrou um aumento do receptor A2A no hipocampo de pacientes com DA (Orr et al., 2015) e que esse aumento estava fortemente relacionado aos sintomas da doença. No entanto, em humanos idosos sem demência, não foi encontrado aumento do receptor A2A (Orr et al., 2015). É interessante ressaltar que esse achado vai ao encontro de experimentos prévios com primatas não-humanos (Bogenpohl et al., 2012).

Nos resultados apresentados nesta tese, o consumo crônico de cafeína preveniu a perda da imunoreatividade do marcador neuronal NeuN na região CA1 do hipocampo – região na qual os pacientes portadores da DA apresentam perda neuronal (Gemmell et al., 2012) – e o aumento dos receptores A2A. É relevante ressaltar que o efeito benéfico da cafeína foi observado somente no modelo de DA. Nos animais controles, a cafeína não produziu nenhum efeito sobre o desempenho na

tarefa. De maneira semelhante, em um estudo utilizando camundongos hAPP (camundongos transgênicos que expressam a mutação da APP humana da DA familiar), a remoção dos receptores A2A melhorou a memória de camundongos idosos (período no qual apresentam abundância de placas amiloides e aumento de receptores A2A), mas não teve efeito quando os testes foram realizados com camundongos jovens (período no qual ainda não apresentam placas amiloides e aumento dos receptores A2A) (Orr et al., 2015). Analisadas em conjunto, essas observações nos permitem especular que o antagonismo do receptor A2A é uma estratégia de proteção eficaz somente em condições patológicas, reforçando a ideia de que a cafeína atua como um restaurador da função cognitiva e não como um “potencializador cognitivo” (revisado em Cunha, 2005).

Apesar da relevância do presente estudo para auxiliar na compreensão dos efeitos da cafeína na preservação da memória, o mecanismo por trás da habilidade da cafeína de prevenir essas modificações ainda não está totalmente estabelecido. Giunta e colaboradores (Giunta et al., 2014) recentemente utilizaram uma abordagem celular com o objetivo de estabelecer o papel dos receptores A1 e A2A (alvos moleculares da cafeína) na toxicidade induzida pelo A β . Em um teste de viabilidade celular, o DPCPX (um antagonista seletivo dos receptores A1) não teve efeito sobre células expostas ao A β . No entanto, a adição de SCH58261 (um antagonista seletivo dos receptores A2A) preveniu totalmente a toxicidade por A β (Giunta et al., 2014). Um possível mecanismo pelo qual a cafeína produz seu efeito neuroprotetor é o de estimulação de cascatas pró-sobrevivência e inibição de vias pró-apoptóticas no córtex e estriado, de acordo com um estudo de Zeitlin e colaboradores (Zeitlin et al., 2011). Nesse estudo, o tratamento com cafeína em um modelo transgênico de DA estimulou a atividade da proteína cinase A (PKA), aumentou os níveis de fosfo-CREB

e reduziu a expressão de fosfo-JNK e fosfo-ERK no estriado, sendo esses processos benéficos para o funcionamento encefálico. Outro mecanismo pelo qual os receptores de adenosina podem estar exercendo seu efeito protetor na DA é o controle da resposta inflamatória. Sabe-se que processos inflamatórios estão presentes na DA (Haskó et al., 2004, 2008) e a patogênese da neurodegeneração tem sido, pelo menos em parte, atribuída à liberação de citocinas pró-inflamatórias no SNC (Fredholm et al., 2000, 2001). Estudos recentes demonstram que a ativação dos receptores de adenosina (especificamente do receptor A2A) pode levar à diminuição da resposta inflamatória (Csóka e Haskó, 2011; Querfurth e LaFerla, 2010; Tarkowski et al., 2001) e à prevenção da toxicidade sináptica induzida pelo A β (Bermejo et al., 2008) por meio da indução da produção da interleucina-10 (IL-10), uma importante citocina anti-inflamatória (Bonotis et al., 2008). Portanto, considerando que o efeito da STZ é baseado no comprometimento da sinalização da insulina no encéfalo, os achados deste trabalho sugerem que os receptores de adenosina podem também ter um papel nesse contexto.

IV. CONCLUSÃO

Esta tese foi dedicada a estudar o efeito do consumo crônico de cafeína sobre a memória, a perda neuronal e os receptores de adenosina A1 e A2A no modelo de DA induzida pela administração i.c.v. de STZ.

Previamente, estudos dedicados à investigação do efeito da cafeína sobre a memória em modelos animais de DA já foram realizados. Tendo em vista que a cafeína é o psicoestimulante mais consumido no mundo e está presente na dieta diária de muitas pessoas, é possível compreender a relevância de tais estudos. No entanto, evidências recentes suportam uma relação entre DA e diabetes. Especificamente, uma

relação entre DA e comprometimento da sinalização insulínica. Partindo do princípio que a resistência central à insulina parece ser um componente importante da etiologia da DA, concluímos que, para sustentar a ideia de que a cafeína protege contra a DA, seria necessário demonstrar que a cafeína também é capaz de promover proteção quando o déficit mnemônico é causado pelo comprometimento da sinalização insulínica no SNC. Neste estudo, a cafeína mostrou-se efetiva em promover neuroproteção, corroborando o papel neuroprotetor do consumo crônico de cafeína na perturbação da memória também sob condições de comprometimento da sinalização encefálica da insulina. Ainda, este estudo reforça a relevância da sinalização aberrante dos receptores de adenosina (especificamente do receptor A2A). Portanto, este aumento dos receptores A2A na DA pode representar um novo alvo terapêutico para reverter o prejuízo cognitivo na DA.

No entanto, apesar da convergência entre estudos epidemiológicos e animais em concluir a importância do receptor A2A no controle da memória no envelhecimento e na DA, a falta de um claro nexo de causalidade entre A2A e disfunção da memória – bem como de uma demonstração molecular das vias afetadas pela ativação anormal do A2A – são fatores críticos na limitação do interesse em ensaios clínicos com antagonistas A2A como estratégia para gerenciar as disfunções da memória relacionadas à DA. Portanto, apesar da relevância dos estudos utilizando manipulações farmacológicas (como o apresentado nesta tese), mais estudos com diferentes abordagens devem ser feitos a fim de melhor identificar possíveis mecanismos patológicos envolvidos na DA. Nesse particular, para definir a relação causal entre regulação positiva do receptor A2A e incidência de neurodegeneração e comprometimento da memória, serão necessários estudos moleculares e de sinalização.

V. PERSPECTIVAS

1. Investigação do efeito do tratamento com cafeína sobre a GSK-3 β .
2. Estudo do efeito de antagonistas do receptor A2A no modelo animal de DA induzida por STZ.
3. Investigação do efeito do tratamento com cafeína após a infusão i.c.v. de STZ.
4. Estudo de sinalização do receptor A2A no hipocampo.

VI. REFERÊNCIAS

- Abbott M A, Wells D G, Fallon J R. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p 58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J Neurosci.* 1999; 19: 7300–7308.
- Agrawal R, Mishra B, Tyagi E, Nath C, Shukla R. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacol Res.* 2010 61:247-252.
- Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011 21:261–273.
- Albasanz JL, Perez S, Barrachina M, Ferrer I, Martín M. Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2008 Apr;18(2):211-9.
- Aluise CD, Sowell RA, Butterfield DA. Peptides and proteins in plasma and cerebrospinal fluid as biomarkers for the prediction, diagnosis, and monitoring of therapeutic efficacy of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Oct;1782(10):549-58.
- Angulo E, Casadó V, Mallol J, Canela EI, Viñals F, Ferrer I, Lluís C, Franco R. A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol.* 2003 Oct;13(4):440-51.
- Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, Shippy D, Tan J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience.* 2006; 142:941-952.
- Arendash, G.W., Mori, T., Cao, C., Mamcarz, M., Runfeldt, M., Dickson, A., Rezai-Zadeh, K., Tane, J., Citron, B.A., Lin, X., et al. Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. *J Alzheimers Dis.* 2009;17:661-680.
- Arnaud MJ. The pharmacology of caffeine. *Prog Drug Res.* 1987;31:273-313.
- Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.* 2004; 447: 735–743.
- Banks W A. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol.* 2004; 490: 5–12.
- Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012 Apr;71(4):266-73.

- Bekris, L.M., Yu, C.E., Bird, T.D., and Tsuang, D.W. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010; 23: 213–227
- Benarroch EE. Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology.* 2008; 70:231-236.
- Bermejo P, Martín-Aragón S, Benedí J, Susín C, Felici E, Gil P, et al. Differences of peripheral inflammatory markers between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Immunol Lett.* 2008;177(2):198–202
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006 Jul 29;368(9533):387-403.
- Blokland A, Jolles J. Behavioral and biochemical effects of an ICV injection of streptozotocin in old Lewis rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994 47:833–837
- Bogenpohl JW, Ritter SL, Hall RA, Smith Y. Adenosine A2A receptor in the monkey basal ganglia: ultrastructural localization and colocalization with the metabotropic glutamate receptor 5 in the striatum. *J Comp Neurol.* 2012 Feb 15;520(3):570-89.
- Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, Brito-Moreira J, Houzel JC, Decker H, Silverman MA, Kazi H, Melo HM, McClean PL, Holscher C, Arnold SE, Talbot K, Klein WL, Munoz DP, Ferreira ST, De Felice FG. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers. *J Clin Invest.* 2012 Apr;122(4):1339-53.
- Bonati M, Latini R, Tognoni G, Young JF, Garattini S. Interspecies comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat, and mouse. *Drug Metab Rev.* 1984-1985;15(7):1355-83.
- Bonotis K, Krikki E, Holeva V, Aggouridaki C, Costa V, Baloyannis S. Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. *J Neuroimmunol.* 2008;193(1–2):183–7.
- Boyd FT Jr, Raizada MK. Effects of insulin and tunicamycin on neuronal insulin receptors in culture. *Am J Physiol.* 1983 Sep;245(3):C283-7.
- Brambilla D, Chapman D, Greene R. Adenosine mediation of presynaptic feedback inhibition of glutamate release. *Neuron.* 2005; 46:275-283.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron.* 1993;10:1089–1099.

- Brundege JM, Diao L, Proctor WR, Dunwiddie TV. The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. *Neuropharmacology*. 1997 Sep;36(9):1201-10.
- Canas PM, Porciúncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, Oliveira CR, Cunha RA. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci*. 2009 Nov 25;29(47):14741-51.
- Canas, P.M., Duarte, J.M., Rodrigues, R.J., Köfalvi, A. & Cunha, R.A. Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus. *Neurobiol. Aging*. 2009; 30, 1877-1884.
- Cao C, Cirrito JR, Lin X, Wang L, Verges DK, Dickson A, Mamcarz M, Zhang C, Mori T, Arendash GW, Holtzman DM, Potter H. Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of Alzheimer's disease transgenic mice. *J Alzheimers Dis*. 2009; 17:681-697.
- Cognato, G.P., Agostinho, P.M., Hockemeyer, J., Müller, C.E., Souza, D.O. & Cunha, R.A. Caffeine and an adenosine A2A receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. *J. Neurochem*. 2010; 112, 453-462.
- Cole GM, Frautschy SA. The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2007; 42: 10–21.
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol*. 1983 Jan;334:33-46.
- Cortese S. The neurobiology and genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): what every clinician should know. *Eur J Paediatr Neurol*. 2012;16:422-433.
- Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Souza DO, Porciuncula LO. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience*. 2008; 153:1071-1078.
- Csóka B, Haskó G. Adenosine, inflammation pathways and therapeutic challenges. *Joint Bone Spine*. 2011;78(1):4–6.
- Cunha GM, Canas PM, Melo CS, Hockemeyer J, Müller CE, Oliveira CR, Cunha RA. Adenosine A2A receptor blockade prevents memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Exp Neurol*. 2008 Apr;210(2):776-81.

- Cunha RA, Agostinho PM. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J Alzheimers Dis.* 2010;20 Suppl 1:S95-116.
- Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int.* 2001; 38:107-125.
- Cupino TL, Zabel MK. Alzheimer's silent partner: cerebral amyloid angiopathy. *Transl Stroke Res.* 2013 Nov 19.
- Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol.* 2007; 203:241-245.
- Daly JW, Padgett WL. Agonist activity of 2- and 5'-substituted adenosine analogs and their N6-cycloalkyl derivatives at A1- and A2-adenosine receptors coupled to adenylate cyclase. *Biochem Pharmacol.* 1992 Mar 3;43(5):1089-93.
- De Felice FG, Vieira MNN, Bomfim TR, et al. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:1971–1976
- de la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005 7:45–61
- de Leon MJ, Convit A, Wolf OT, Tarshish CY, DeSanti S, Rusinek H, Tsui W, Kandil E, Scherer AJ, Roche A, Imossi A, Thorn E, Bobinski M, Caraos C, Lesbre P,
- de Mendonca A, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 33:258-274.
- Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int* 2002 61:939–950
- Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 2007 Aug;6(8):734-46.
- Deussen A, Lloyd HG, Schrader J. Contribution of S-adenosylhomocysteine to cardiac adenosine formation. *J Mol Cell Cardiol.* 1989 21: 773–782.
- Deussen A. Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000; 362: 351–363.

- Devaskar S U, Giddings S J, Rajakumar P A, Car- Naghi L R, Menon R K, Zahn D S. Insulin gene expres- sion and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem.* 1994; 269: 8445–8454
- Devoe LD, Murray C, Youssif A, Arnaud M. Maternal caffeine consumption and fetal behavior in normal third-trimester pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 168:1105-1111; discussion 1111-1102.
- Dixon AK, Gubitz AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol.* 1996 Jul;118(6):1461-8.
- Duarte, J.M., Carvalho, R.A., Cunha, R.A. & Gruetter, R. Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Neurochem.* 2009; 111, 368-379.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Eltzschig HK. Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology.* 2009 Oct;111(4):904-15.
- Elvander-Tottie E, Eriksson TM, Sandin J, Ogren SO. N-methyl-D-aspartate receptors in the medial septal area have a role in spatial and emotional learning in the rat. *Neuroscience.* 2006 Nov 3;142(4):963-78.
- Emma R. Wood, Paul A. Dudchenko and Howard Eichenbaum. The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* 397, 613-616(18 February 1999).
- Eskelinen, M.H., Ngandu, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., and Kivipelto, M. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population- based CAIDE study. *J Alzheimers Dis.* 2009; 16:85-91.
- Ferré S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1997; 20:482-487.
- Ferré S, Popoli P, Rimondini R, Reggio R, Kehr J, Fuxe K. Adenosine A2A and group I metabotropic glutamate receptors synergistically modulate the binding characteristics of dopamine D2 receptors in the rat striatum. *Neuropharmacology.* 1999 Jan;38(1):129-40.
- Ferré S, Popoli P, Tinner-Staines B, Fuxe K. Adenosine A1 receptor-dopamine D1 receptor interaction in the rat limbic system: modulation of dopamine D1 receptor antagonist binding sites. *Neurosci Lett.* 1996 Apr 19;208(2):109-12.
- Ferré S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem.* 2008;105:1067-1079.

- Ferrer I, Barrachina M, Puig B. Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol.* 2002;104:583-591.
- Flagmeyer I, Haas HL, Stevens DR. Adenosine A1 receptor-mediated depression of corticostriatal and thalamostriatal glutamatergic synaptic potentials in vitro. *Brain Res.* 1997; 778:178-185.
- Florán B, Barajas C, Florán L, Erlij D, Aceves J. Adenosine A1 receptors control dopamine D1-dependent [(3)H]GABA release in slices of substantia nigra pars reticulata and motor behavior in the rat. *Neuroscience.* 2002;115(3):743-51.
- Fredholm B, Chen JF, Masino SA, Vaugeois JM. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: Insights from knockouts and drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005;45.
- Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000 Nov;362(4-5):364-74.
- Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362(4-5):364-74.
- Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zwartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999; 51:83-133.
- Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol.* 2005;63:191-270.
- Fredholm BB, Cunha RA, Svenningsson P. Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr Top Med Chem.* 2003; 3:413-426.
- Gahr M, Nowak DA, Connemann BJ, Schönfeldt-Lecuona C. Cerebral amyloid angiopathy— a disease with implications for neurology and psychiatry. *Brain Res.* 2013;26(1519):19-30.
- Gelber, R.P., Petrovitch, H., Masaki, K.H., Ross, G.W., and White, L.R. Coffee intake in midlife and risk of dementia and its neuropathologic correlates. *J Alzheimers Dis.* 2011; 23:607-615.
- Gemmell E, Bosomworth H, Allan L, Hall R, Khundakar A, Oakley AE, Deramecourt V, Polvikoski TM, O'Brien JT, Kalara RN. Hippocampal neuronal atrophy and cognitive function in delayed poststroke and aging-related dementias. *Stroke.* 2012; 43, 808-814.
- Gimenez-Llort L, Schiffmann SN, Shmidt T, Canela L, Camon L, Wassholm M, Canals M, Terasmaa A, Fernandez-Teruel A, Tobena A, Popova E, Ferre S,

- Agnati L, Ciruela F, Martinez E, Scheel-Kruger J, Lluís C, Franco R, Fuxe K, Bader M. Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain. *Neurobiol Learn Mem.* 2007; 87:42-56.
- Giunta S, Andriolo V, Castorina A. Dual blockade of the A1 and A2A adenosine receptor prevents amyloid beta toxicity in neuroblastoma cells exposed to aluminum chloride. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Sep;54:122-36.
- Golembiowska K, Zylewska A. Adenosine receptors--the role in modulation of dopamine and glutamate release in the rat striatum. *Pol J Pharmacol.* 1997; 49:317-322.
- Gregor MF, Hotamisligil G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 415–445
- Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem.* 2007; 101: 757–770.
- Hameleers PA, Van Boxtel MP, Hogervorst E, Riedel WJ, Houx PJ, Buntinx F, Jolles J. Habitual caffeine consumption and its relation to memory, attention, planning capacity and psychomotor performance across multiple age groups. *Hum Psychopharmacol.* 2000; 15:573-581.
- Handbook of Animal Models in Alzheimer's Disease. G. Casadesus (Ed.). IOS Press, 2011.
- Hanger DP, Lau DH, Phillips EC, Bondulich MK, Guo T, Woodward BW, Pooler AM, Noble W. Intracellular and extracellular roles for tau in neurodegenerative disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;40 Suppl 1:S37-45
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002; 297:353-356.
- Haskó G, Sitkovsky MV, Szabó C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(3):152–7.
- Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(9):759–70.
- Hershfield MS. New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur J Immunol* 2005 35: 25–30.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002 Nov 21;420(6913):333-6.

- Hoyer S, Lannert H. Long-term abnormalities in brain glucose/ energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau-protein. *J Neural Transm Suppl.* 2007 72:195–202
- Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol.* 2004 490:115–125
- Hoyer S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of noninsulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm* 1998 105:415–422
- Hung AY, Koo EH, Haass C, Selkoe DJ. Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 89:9439-9443.
- Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VM. Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron.* 1999;24:751–762.
- Jaarsma D, Sebens JB, Korf J. Reduction of adenosine A1-receptors in the perforant pathway terminal zone in Alzheimer hippocampus. *Neurosci Lett.* 1991 Jan 2;121(1-2):111-4.
- Jansen KL, Faull RL, Dragunow M, Synek BL. Alzheimer's disease: changes in hippocampal N-methyl-D-aspartate, quisqualate, neurotensin, adenosine, benzodiazepine, serotonin and opioid receptors--an autoradiographic study. *Neuroscience.* 1990;39(3):613-27.
- Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Giménez-Llort L et al. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9407–9412.
- Johnston A M, Pirola L, Van Obberghen E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *FEBS Lett.* 2003; 546: 32–36.
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969 48:2129–2139
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 1987 Feb 19-25;325(6106):733-6.
- Karch CM, Jeng AT, Goate AM. Extracellular Tau levels are influenced by variability in Tau that is associated with tauopathies. *J Biol Chem.* 2012 Dec 14;287(51):42751-62.

- Lachance MP, Marlowe C, Waddell WJ (1983) Autoradiographic disposition of [1-methyl-14C]- and [2-14C]caffeine in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1983; 71:237-241.
- Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci.* 1998 112:1199–1208
- Laurent C, Burnouf S, Ferry B, Batalha VL, Coelho JE, Baqi Y, Malik E, Mariciniak E, Parrot S, Van der Jeugd A, Faivre E, Flaten V, Ledent C, D'Hooge R, Sergeant N, Hamdane M, Humez S, Müller CE, Lopes LV, Buée L, Blum D. A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. *Mol Psychiatry.* 2014 Dec 2. doi: 10.1038/mp.2014.151.
- Lee CC, Huang CC, Hsu KS. Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. *Neuropharmacology.* 2011 Sep; 61(4):867-79.
- Lee CC, Huang CC, Wu MY, Hsu KS. Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biol Chem.* 2005 May 6; 280(18):18543-50.
- Leite MR, Wilhelm EA, Jesse CR, Brandao R, Nogueira CW. Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. *Exp Gerontol.* 2011;46:309-315.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008 51:216–226
- Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2006 9:13-33.
- Li P, Rial D, Canas PM, Yoo JH, Li W, Zhou X, Wang Y, van Westen GJ, Payen MP, Augusto E, Gonçalves N, Tomé AR, Li Z, Wu Z, Hou X, Zhou Y, PIJzerman A, Boyden ES, Cunha RA, Qu J, Chen JF. Optogenetic activation of intracellular adenosine A2A receptor signaling in the hippocampus is sufficient to trigger CREB phosphorylation and impair memory. *Mol Psychiatry.* 2015 Mar 24. doi: 10.1038/mp.2015.43.
- Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41:775-787.
- Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hébert, R., Helliwell, B., Hill, G.B., and McDowell, I. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol.* 2002; 156:445-453.
- Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ, Chen PP, Hudspeth B, Chen C, Zhao Y, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM. Beta-amyloid

- oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J Neurosci*. 2009 Jul 15;29(28):9078-89.
- Maemoto T, Tada M, Mihara T, Ueyama N, Matsuoka H, Harada K, Yamaji T, Shirakawa K, Kuroda S, Akahane A, Iwashita A, Matsuoka N, Mutoh S. Pharmacological characterization of FR194921, a new potent, selective, and orally active antagonist for central adenosine A1 receptors. *J Pharmacol Sci*. 2004 Sep;96(1):42-52.
- Mahan LC, McVittie LD, Smyk-Randall EM, Nakata H, Monsma FJ Jr, Gerfen CR, Sibley DR. Cloning and expression of an A1 adenosine receptor from rat brain. *Mol Pharmacol*. 1991 Jul;40(1):1-7.
- Maren S, Aharonov G, Stote DL, Fanselow MS. N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav Neurosci*. 1996 Dec;110(6):1365-74.
- Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res*. 1990; 532:95-100.
- Morgan KJ, Stults VJ, Zabik ME (1982) Amount and dietary sources of caffeine and saccharin intake by individuals ages 5 to 18 years. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1982; 2:296-307.
- Nelson PT, Alafuzoff, Bigio EH, Bouras C et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 May;71(5):362-81.
- Neugroschl J, Sano M. An update on treatment and prevention strategies for Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2009; 9:368-376.
- Normile HJ, Barraco RA. N6-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A1 receptors. *Brain Res Bull*. 1991 Jul;27(1):101-4.
- Okada M, Mizuno K, Kaneko S. Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neurosci Lett*. 1996; 212:53-56.
- Ongini E, Adami M, Ferri C, Bertorelli R. Adenosine A2A receptors and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci*. 1997; 825:30-48.
- Orr AG, Hsiao EC, Wang MM, Ho K, Kim DH, Wang X, Guo W, Kang J, Yu GQ, Adame A, Devidze N, Dubal DB, Masliah E, Conklin BR, Mucke L. Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. *Nat Neurosci*. 2015 Mar;18(3):423-34.
- Pagnussat N, Almeida AS, Marques DM, Nunes F, Chenet GC, Botton PH, Mioranza S, Loss CM, Cunha RA, Porciúncula LO. Adenosine A2A

- receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. *Br J Pharmacol*. 2015 May 4. doi: 10.1111/bph.13180.
- Panegyres PK. The amyloid precursor protein gene: a neuropeptide gene with diverse functions in the central nervous system. *Neuropeptides*. 1997 Dec;31(6):523-35.
- Pedata F, Corsi C, Melani A, Bordoni F, Latini S. Adenosine extracellular brain concentrations and role of A2A receptors in ischemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 939:74-84.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VMY, Klein PS. GSK-3b regulates production of Alzheimer's disease amyloid-a peptides. *Nature*. 2003; 423: 435–439.
- Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Spychala J, Boucher RC. Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem* 2003; 278: 13468–13479
- Pooler AM, Phillips EC, Lau DH, Noble W, Hanger DP. Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep*. 2013 Apr;14(4):389-94.
- Popoli P, Pèzzola A, Torvinen M, Reggio R, Pintor A, Scarchilli L, Fuxe K, Ferré S. The selective mGlu(5) receptor agonist CHPG inhibits quinpirole-induced turning in 6-hydroxydopamine-lesioned rats and modulates the binding characteristics of dopamine D(2) receptors in the rat striatum: interactions with adenosine A(2a) receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2001 Oct;25(4):505-13.
- Prediger RD, Batista LC, Takahashi RN. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol Aging*. 2005; 26:957-964
- Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1999 Mar;45(3):358-68.
- Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010;362(4):329–44.
- Rebola N, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience*. 2005;132(4):893-903.
- Rebola N, Pinheiro PC, Oliveira CR, Malva JO, Cunha RA. Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res*. 2003 Oct 10;987(1):49-58.
- Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2011 Mar;7(3):137-52.

- Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol.* 2002; 68:377-392.
- Ritchie, K., Carrière, I., Portet, F., de Mendonca, A., Dartigues, J.F., Rouaud, O., Barberger-Gateau, P., and Ancelin, M.L. 2007. The neuro-protective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology.*
- Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enjyoji K. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 217–233
- Rosenberg PA, Li Y. Adenylyl cyclase activation underlies intracellular cyclic AMP accumulation, cyclic AMP transport, and extracellular adenosine accumulation evoked by beta-adrenergic receptor stimulation in mixed cultures of neurons and astrocytes derived from rat cerebral cortex. *Brain Res.* 1995 Sep 18;692(1-2):227-32.
- Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl* 2007 72:217–233
- Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J Neurochem.* 2006 96:1005-1015.
- Saxena G, Patro IK, Nath C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: a protective role of nicotinic receptor. *Behav Brain Res.* 2011 224:50–57
- Schechter R, Beju D, Gaffney T, Schaefer F, Whet-Sell L. Preproinsulin I and II mRNAs and insulin electron microscopic immuno-reaction are present within the fetal nervous system. *Brain Res.* 1996; 736: 16–27
- Schlyer D, Poirier J, Reisberg B, Fowler J. Prediction of cognitive decline in normal elderly subjects with 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose/positron-emission tomography (FDG/PET). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11;98(19):10966-71.
- Schubert P, Komp W, Kreutzberg GW. Correlation of 5'-nucleotidase activity and selective transneuronal transfer of adenosine in the hippocampus. *Brain Res.* 1979 May 25;168(2):419-24.
- Schwarzschild MA, Chen JF, Ascherio A. Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD. *Neurology.* 2002; 58:1154-1160.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001 81:741-766.

- Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology*. 2007 52:836-843.
- Sik A, van Nieuwehuyzen P, Prickaerts J, Blokland A. Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behav Brain Res*. 2003; 147:49-54.
- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes? *J Alzheimer's Dis*. 2005 7:63–80
- Storey E, Spurck T, Pickett-Heaps J, Beyreuther K, Masters CL. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not activity motile portions of neurites. *Brain Res* 1996 735:59-66.
- Tabrizchi R, Bedi S. Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. *Pharmacol Ther*. 2001; 91: 133–147.
- Takeda S, Sato N, Rakugi H, Morishita R. Molecular mechanisms linking diabetes mellitus and Alzheimer disease: beta-amyloid peptide, insulin signaling, and neuronal function. *Mol Biosyst*. 2011 Jun;7(6):1822-7.
- Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest*. 2012 Apr;122(4):1316-38.
- Tanaka H, Nakazawa K, Arima M, Iwasaki S. Caffeine and its dimethylxanthines and fetal cerebral development in rat. *Brain Dev*. 1984; 6:355-361.
- Tarkowski E, Liljeroth AM, Nilsson a, Minthon L, Blennow K. Decreased levels of intrathecal interleukin 1 receptor antagonist in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2001;12(5):314–7.
- Thies W, Bleiler L. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 7 (March (2)) 2011; pp. 208–244.
- Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 2008; 283:29615-29619.
- Thomas DM, Francescutti-Verbeem DM, Liu X et al. Identification of differentially regulated transcripts in mouse striatum following methamphetamine treatment—an oligonucleotide microarray approach. *J Neurochem*. 2004; 88(2):380–393.

- Ułtas J, Brunner LC, Nguyen L, Cotman CW. Reduced density of adenosine A1 receptors and preserved coupling of adenosine A1 receptors to G proteins in Alzheimer hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience*. 1993 Feb;52(4):843-54.
- van Boxtel, M.P., Schmitt, J.A., Bosma, H., and Jolles, J. The effects of habitual caffeine use on cognitive change: a longitudinal perspective. *Pharmacol Biochem Behav* . 2003; 75:921-927.
- van der Heide L P, Ramakers G M J, Smidt M P. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. *Prog Neurobiol* 2006; 79: 205–221.
- van Gelder, B.M., Buijsse, B., Tijhuis, M., Kalmijn, S., Giampaoli, S., Nissinen, A., and Kromhout, D. Coffee consumption is inversely associated with cognitive decline in elderly European men: the FINE Study. *Eur J Clin Nutr*. 2007; 61:226-232.
- Vila-Luna, S., Cabrera-Isidoro, S., Vila-Luna, L., Juarez-Diaz, I., Bata-Garcia, J.L., Alvarez-Cervera, F.J., Zapata-Vazquez, R.E., Arankowsky-Sandoval, G., Heredia-Lopez, F., Flores, G., et al. Chronic caffeine consumption prevents cognitive decline from young to middle age in rats, and is associated with increased length, branching, and spine density of basal dendrites in CA1 hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2012;202:384-395.
- Wang JH, Ma YY, van den Buuse M. Improved spatial recognition memory in mice lacking adenosine A2A receptors. *Exp Neurol*. 2006; 199:438-445.
- Wang JQ, Yin J, Song YF, Zhang L, Ren YX, Wang DG, Gao LP, Jing YH. Brain aging and AD-like pathology in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes Res*. 2014;2014:796840. doi: 10.1155/2014/796840.
- Wang JZ, Gao X, Wang ZH. The physiology and pathology of microtubule-associated protein tau. *Essays Biochem*. 2014;56:111-23.
- Weyandt LL, Oster DR, Marraccini ME, Gudmundsdottir BG, Munro BA, Zavras BM, Kuhar B. Pharmacological interventions for adolescents and adults with ADHD: stimulant and nonstimulant medications and misuse of prescription stimulants. *Psychol Res Behav Manag*. 2014 Sep 9;7:223-49.
- Wolraich M, Brown L, Subcommittee on Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder, Steering Committee on Quality Improvement and Management et al. ADHD: clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. *Pediatrics*. 2011; 128(5):1007–1022
- Wood PL, Kim HS, Boyar WC, Hutchison A. Inhibition of nigrostriatal release of dopamine in the rat by adenosine receptor agonists: A1 receptor mediation. *Neuropharmacology*. 1989; 28:21-25.

- Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ. Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells. *J Neurosci* 1997 17:1004-1010.
- Zeitlin R, Patel S, Burgess S, Arendash GW, Echeverria V. Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice. *Brain Res.* 2011;12(1417):127–36.
- Zhao WQ, De Felice FG, Fernandez S, et al. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J* 2008;22:246–260
- Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000 362: 299–309.