



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

INSTITUTO DO CÉREBRO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS

PRISCILA TAVARES MACÊDO

**A CAFEÍNA EXERCE EFEITOS POSITIVOS SOBRE A MEMÓRIA TIPO-
EPISÓDICA EM RATOS ADULTOS SEM INFLUENCIAR A
SOBREVIVÊNCIA NEURONAL NO GIRO DENTEADO**

NATAL/RN

2012

PRISCILA TAVARES MACÊDO

**A CAFEÍNA EXERCE EFEITOS POSITIVOS SOBRE A MEMÓRIA TIPO-
EPISÓDICA EM RATOS ADULTOS SEM INFLUENCIAR A
SOBREVIVÊNCIA NEURONAL NO GIRO DENTEADO**

*Dissertação Apresentada ao Instituto do
Cérebro da Universidade Federal do Rio
Grande do Norte, Como Requisito Parcial à
Obtenção do Título de Mestre em
Neurociências.*

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Regina Helena da Silva.

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcos Romualdo Costa.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Neurofisiologia Comportamental.

NATAL/RN

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE

M141c Macêdo, Priscila Tavares.

A cafeína exerce efeitos positivos sobre a memória tipo episódica em ratos adultos sem influenciar a sobrevivência neural no giro dentado / Priscila Tavares Macêdo. - Natal, 2012.

119p.

Dissertação (Mestrado em Neurociências). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Pró-reitora de Pós-Graduação.
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Regina Helena da Silva.

1. Neurociências – Dissertação. 2. Cafeína. 3. Memória tipo-episódica. 4. Neurogênese. I, Título

RN/UFRN/ICe

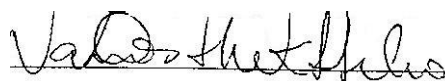
CDU: 616.8

PRISCILA TAVARES MACÊDO

**A CAFEÍNA EXERCE EFEITOS POSITIVOS SOBRE A MEMÓRIA TIPO-
EPISÓDICA EM RATOS ADULTOS SEM INFLUENCIAR A
SOBREVIVÊNCIA NEURONAL NO GIRO DENTEADO**

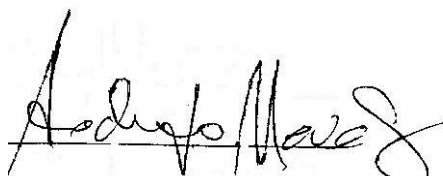
Apresentada em abril de 2012.

BANCA EXAMINADORA



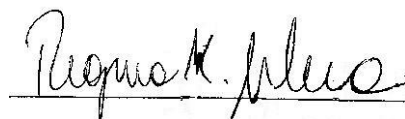
Prof.^a Dr.^a. Vanessa Costhek Abílio.

UNIFESP



Prof. Dr. Rodrigo Neves Romcy Pereira.

UFRN



Prof.^a. Dr.^a. Regina Helena da Silva.

UFRN

Natal-RN

2012

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, possibilidade de estudo, pela força espiritual enviada nos momentos mais cansativos e difíceis.

Aos meus familiares tão queridos. A meus pais, Eliede e Elda, pela força e compreensão, sempre presentes e pelo carinho imensurável. A meus irmãos (Renata, Mateus e Julia) com suas diferentes formas de ajudar e demonstrar sentimentos fraternos. A meus tios Edna e, seu marido, Militão, os quais me acolheram em sua casa para que eu tivesse um ensino superior e pós-graduação. À minha tia-mãe Mazinha por ser uma amiga sempre disposta a ouvir e me aconselhar, agradeço imensamente sua paciência e compreensão. Às minhas tias-avós que sempre ofereceram cuidados maternos a mim e a meus irmãos, Carminha e Dadá, essa já falecida, continua a cuidar de nós, ainda que seu corpo não esteja mais presente.

As minhas verdadeiras amigas. Às amigas de infância: Odete Clara e Daliana Dantas. E a minha amiga mais recente e cujo sentimento cresceu rapidamente, com seu jeito sempre alegre e acolhedor, Kelly Soares. A todas elas, agradeço por estarem sempre presentes em minha vida, ainda que, muitas vezes, distantes fisicamente. A amizade não se mede pela proximidade física, mas pelo vínculo do sentimento de segurança, que se firma a qualquer distância, quando o sentimento é autêntico. Não tenho nenhuma dúvida de que posso contar com essas amigas queridas em qualquer momento.

A minha orientadora, professora Dr.^a Regina Helena da Silva, que me acompanha desde a iniciação científica, há cerca de quatro anos; e ao meu co-orientador, professor Dr. Marcos Romualdo Costa, que me acompanhou durante todo o mestrado. Eles me ensinaram o valor do amor e da dedicação pela ciência, agregando bastante conhecimento a minha formação.

A todos os profissionais que direta ou indiretamente me auxiliaram na execução desse trabalho. A todos os meus colegas de laboratório, em especial, àqueles que trabalharam comigo na execução dos experimentos, em qualquer situação, feriado ou fim de semana, ao meu amigo José Ronaldo dos Santos; a Flávio Barbosa; a André Medeiros; a Fernando Roberto e a João Cunha. Ao laboratório de Neuroanatomia da

UFRN que permitiu a execução de muitas etapas do protocolo em suas dependências, principalmente à gentil professora Dr.^a Miriam, sempre disponível para ajudar.

A essa instituição de ensino superior e ao Instituto do Cérebro que possibilitaram subsídios à execução do nosso trabalho, juntamente com as agências de fomento científico, CAPES, CNPq e FAPERN. Agradeço também ao Instituto Internacional de Neurociências de Natal (IINN-ELS), onde parte dos experimentos foi executada.

Agradeço imensamente a toda ajuda para execução desse trabalho. Ajuda que ultrapassou o âmbito profissional e permitiu meu crescimento pessoal devido ao contato com profissionais tão dedicados e à formação de vínculos de amizade.

RESUMO

A cafeína é um leve psicoestimulante que em baixas doses tem efeitos cognitivos e mnemônicos positivos, enquanto em altas doses tende a possuir efeitos prejudiciais sobre esses processos. A memória tipo-episódica em roedores pode ser avaliada com tarefas hipocampo-dependentes. O giro denteado é uma subregião hipocampal onde ocorre neurogênese no adulto, e acredita-se que esse processo esteja relacionado à sua função de separação de padrões, ou seja, identificação de padrões espaço-temporais para discriminar eventos. Além disso, a neurogênese é influenciada pelo aprendizado de tarefas espaciais e contextuais. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos comportamentais em tarefas tipo-episódicas, em ratos Wistar machos, submetidos a tratamentos agudo ou crônico com cafeína, nas doses de 15mg/kg ou 30mg/kg. Além disso, procuramos avaliar as relações do efeito crônico da cafeína, em doses baixa e elevada, bem como da influência do aprendizado de tarefas hipocampo-dependentes, sobre a sobrevivência de neurônios nascidos no início do tratamento, fazendo uso de BrdU para marcar novas células geradas no giro denteado. Quanto ao tratamento agudo, vimos que o grupo salina tendeu a apresentar melhor discriminação temporal e espacial que os grupos cafeína, nas tarefas executadas. Os resultados do tratamento crônico mostraram que houve melhor discriminação do grupo cafeína 15 mg/kg (dose baixa) quanto ao aspecto temporal da memória episódica; já o grupo cafeína 30mg/kg (dose alta) conseguiu discriminar melhor temporalmente em condição de maior dificuldade de execução em comparação a menor dificuldade. Avaliação da neurogênese por meio de imunohistoquímica para contagem de novos neurônios gerados no giro denteado não revelou nenhuma diferença entre os grupos do tratamento crônico. Assim, os efeitos positivos mnemônicos do tratamento crônico com cafeína não estão relacionados com a sobrevivência neuronal. Entretanto, outro mecanismo plástico deve explicar o efeito mnemônico positivo, haja vista que não houve melhora nos grupos tratados com cafeína administrada agudamente.

PALAVRAS-CHAVE: Cafeína; memória tipo-episódica; hipocampo; giro denteado; neurogênese; sobrevivência neuronal.

ABSTRACT

The caffeine is a mild psychostimulant that has positive cognitive effects at low doses, while promotes detrimental effects on these processes at higher doses. The episodic-like memory can be evaluated in rodents through hippocampus-dependent tasks. The dentate gyrus is a hippocampal subregion in which neurogenesis occurs in adults, and it is believed that this process is related to the function of patterns separation, such as the identification of spatial and temporal patterns when discriminating events. Furthermore, neurogenesis is influenced spatial and contextual learning tasks. Our goal was to evaluate the performance of male Wistar rats in episodic-like tasks after acute or chronic caffeine treatment (15mg/kg or 30mg/kg). Moreover, we assessed the chronic effect of the caffeine treatment, as well as the influence of the hippocampus-dependent learning tasks, on the survival of new-born neurons at the beginning of treatment. For this purpose, we used BrdU to label the new cells generated in the dentate gyrus. Regarding the acute treatment, we found that the saline group presented a tendency to have better spatial and temporal discrimination than caffeine groups. The chronic caffeine group 15 mg/kg (low dose) showed the best discrimination of the temporal aspect of episodic-like memory, whereas the chronic caffeine group 30mg/kg (high dose) was able to discriminate temporal order, only in a condition of greater difficulty. Assessment of neurogenesis using immunohistochemistry for evaluating survival of new-born neurons generated in the dentate gyrus revealed no difference among groups of chronic treatment. Thus, the positive mnemonic effects of the chronic caffeine treatment were not related to neuronal survival. However, another plastic mechanism could explain the positive mnemonic effect, given that there was no improvement in the acute caffeine groups.

KEYWORDS: Caffeine; episodic like-memory; hippocampus; dentate gyrus; neurogenesis; neuronal survival.

SUMÁRIO

1. Introdução	10
1.1. Cafeína	10
1.2. Memória episódica e tarefas de reconhecimento de objetos	15
1.3. Neurogênese	22
2. Justificativa	26
3. Objetivos	26
3.1. Geral	26
3.2. Específicos	27
4. Materiais e métodos	27
4.1. Sujeitos experimentais e procedimentos gerais	27
4.2. Tratamento farmacológico	28
4.3. Tarefas comportamentais	29
4.4. Delineamento experimental	33
4.4.1. Tratamento agudo	33
4.4.2. Tratamento crônico	34
4.5. Análise imunohistoquímica	34
4.6. Análises estatísticas	37
5. Resultados	37
5.1. Tratamento agudo	37
5.1.1. Tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal	37
5.1.2. Tarefa de ordem temporal para localizações espaciais	43
5.1.2.1. Alta interferência	43
5.1.2.2. Baixa interferência	47
5.2. Tratamento crônico	51
5.2.1. Tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal	51
5.2.2. Tarefa de ordem temporal para localizações espaciais	57
5.2.2.1. Alta interferência	58
5.2.2.2. Baixa interferência	60
5.2.3. Contagem celular	63
6. Discussão	66
7. Considerações finais e conclusões	88

Referências bibliográficas	90
ANEXO 1	115
ANEXO 2	117

1. Introdução

1.1. Cafeína

A cafeína ou 1,3,7-trimetilxantina é um alcalóide purínico (Spiller, 1998) e se constitui na substância psicoativa mais consumida no mundo, por cerca de 80 % da população mundial (James, 1997), devido à presença em alimentos como o café, os chás, os refrigerantes à base de cola e o chocolate (Daly & Fredholm, 1998).

A cafeína, assim como seus metabólitos (paraxantina e teofilina), são estimulantes do sistema nervoso (Snyder, et al., 1981) capazes de melhorar funções cognitivas e intelectuais, tais como, alerta, sensação de bem-estar (Strain & Griffiths, 1995), humor, atividade psicomotora (Smith, 2002), redução do tempo de reação e melhora da memória (Riedel, et al., 1995), principalmente em baixas doses.

Seu mecanismo de ação sobre os receptores de adenosina a torna potencialmente aditiva (Gilliland & Bullock, 1984; Nehlig, 1999; Griffiths & Chausmer, 2000), podendo produzir uma síndrome de dependência química (Nehlig, 1999). Essa possibilidade é estimulada por seus efeitos comportamentais (Griffiths & Chausmer, 2000) ao reforçar temporariamente o desempenho cognitivo (Ryan, et al., 2002), ocorrendo o efeito contrário devido a sua retirada (Bernstein, et al., 2002).

A cafeína parece promover seus efeitos de forma dose-dependente, possuindo ação psicoestimulante e induzindo melhora mnemônica com baixas doses (Snyder, et al., 1981; Roussinov & Yonkov, 1976; Bernstein, et al., 1994; Cestari & Castellano, 1996), enquanto exibe efeitos contrários em doses moderadas e elevadas (Daly & Fredholm, 2004; Izquierdo, et al., 1979; Molinengo, et al., 1995; Fisher & Guillet, 1997; Lister, 1987; Silva & Frussa-Filho, 2000). Em relação ao seu efeito ansiogênico, sugere-se que a cafeína promova efeitos deletérios na memória em altas doses devido ao aumento dos níveis de ansiedade (Smith, et al., 1997; Silva & Frussa-Filho, 2000). Tanto doses elevadas quanto a associação do fármaco a estímulos estressores podem reverter seus efeitos positivos no desempenho (Frewer & Lader, 1991; Smith, et al., 1991). Doses baixas a moderadas refletem um estado positivo no indivíduo propiciando aumento do ânimo (Mikalsen, et al., 2001).

Muitos estudos mostram que a cafeína reduz o tempo de reação e a taxa de erro em tarefas com tempo de reação simples (Wesensten, et al., 2005), escolha do tempo de reação (Kenemans & Lorist, 1995; Lieberman, et al., 2002) e vigilância visual (Fine, et al., 1994; Lieberman, et al., 2002). Investigações em humanos revelaram que a cafeína reforça o desempenho na recordação com retardo (Warburton, 1995), na memória de reconhecimento (Bowyer, et al., 1983), na semântica (Oborne & Rogers, 1983), na de trabalho (Sawyer, et al., 1982), em tarefas verbais (Jarvis, 1993), na evocação de memórias de curto e longo prazo e eleva a eficiência na codificação (Riedel, et al., 1995; Smith, et al., 1999). Age também melhorando o desempenho em tarefas de atenção seletiva (Lorist, et al., 1995; Warburton, 1995) e em tarefas de atenção dividida (Pons, et al., 1988; Kenemans, et al., 1999; Lorist & Snel, 1997; Lorist, et al., 1996; Ruijter, et al., 2000). Parece ser capaz de aumentar a velocidade de processamento além de reduzir a distração (Lorist & Snel, 1997; Streufert, et al., 1997; Smith, et al., 2001; Smith, 2002). O consumo crônico da cafeína tem mostrado ser efetivo na atenuação do declínio da memória em idosos (Ritchie, et al., 2007; Riedel e Jolles, 1996). Facilita a memória e o aprendizado em roedores submetidos a tarefas de esquiva inibitória (Pereira, et al., 2002), esquiva passiva (Kopf, et al, 1999; Zarrindast & Shafaghi, 1994; Suzuki, et al., 1993) e labirinto aquático de Morris (Angelucci, et al., 2002; Dudley, et al., 1994). Há evidência que o bloqueio combinado de receptores A1 e A2a facilita o desempenho de ratos em testes de memória espacial, sugerindo-se seu envolvimento na potenciação de longa duração¹ (LTP) hipocampal (Arai, et al., 1990).

A cafeína antagoniza, de forma não seletiva, receptores metabotrópicos de adenosina pré-sinápticos; a inativação desses receptores permite a liberação de acetilcolina (Sattin & Rall, 1970; Fredholm, 1980), o qual se acredita ser um dos principais neurotransmissores implicados com o armazenamento de memórias (Deutsch, 1974). A cafeína possui, teoricamente, uma grande diversidade de mecanismos de ação que poderiam ser responsáveis por seus efeitos estimulatórios sobre a cognição e a memória. No entanto, na prática, em doses habitualmente usadas, o mecanismo mais provável é o antagonismo de receptores de adenosina (Sallin & Rall, 1970) que pode levar a alterações sinápticas, modificando metabólica e bioquimicamente sua atividade, o que significa alterações na estrutura e na função do hipocampo e neocórtex, locais onde ocorre plasticidade (Bliss & Collingridge, 1993; Buonomano & Merzenich, 1998). Os demais mecanismos de ação dependem de doses muito elevadas (Daly & Fredholm,

2004), em torno de 500 a 600 mg por dia, o que seria tóxico (James & Stirling, 1983). Tais doses de cafeína promoveriam: a ativação de receptores de rianodina resultando na liberação de cálcio no meio intracelular, o que modula o processo de transmissão do impulso nervoso e liberação de neurotransmissor (Berridge, 1998; Ehrlich, 1995); o bloqueio de receptores GABA-A levando à depressão de sinapses inibitórias (Koninck & Mody, 1996); o bloqueio a fosfodiesterases propiciando a acumulação de AMPc que funciona como segundo mensageiro na fosforilação de proteínas e expressão genética (Fredholm, et al., 1994; 1999). Todas essas ações, incluindo o antagonismo de receptores de adenosina, resultariam em aumento da eficiência de transmissão e alteração na morfologia sináptica. No nível de rede neuronal, a cafeína ativaria o córtex neural permitindo o envio de sinais repetitivos dependentes de receptores NMDA para áreas circunvizinhas levando ao aumento de comunicações inter-corticais (Yoshimura, et al., 2003). Em virtude desses mecanismos, a cafeína poderia reorganizar a rede neuronal por meio da mobilização sináptica (ver Yoshimura, 2005 para revisão).

Adenosina é um neuromodulador ubíquo do sistema nervoso central (Dunwiddie, 1985; Greene & Haas, 1991; McIlwain & Poll, 1986), sintetizado por células gliais e neurônios, sendo liberado no espaço extracelular durante estados de fadiga e sono (Feldberg & Sherwood, 1954; Haulilca, et al., 1973). Suas ações são mediadas por receptores A1, A2a, A2b e A3, acoplados a proteína G (Ralevic & Burnstock, 1998). A adenosina modula a excitabilidade neuronal pelo decréscimo na taxa de disparo (Phillis, et al., 1975) e inibe a liberação de neurotransmissores como glutamato (Brand, et al., 2001; Dolphin & Archer, 1983), aspartato (Burke & Nadler, 1988), acetilcolina (Jackisch, et al., 1984) e ácido γ -aminobutírico (Bonci & Williams, 1996; Chamberlin, et al., 2003). Esses efeitos têm sido atribuídos à ativação de receptores pré-sinápticos adenosina tipo A1, portanto, o neuromodulador tem sido proposto como agente neuroprotetor na isquemia, acidente vascular encefálico, epilepsia, doença de Alzheimer e Parkinson (Dall'Igna, et al., 2003; Ikeda, et al., 2002; Ribeiro, et al., 2002; Stone, 2002). Agonistas adenosinérgicos são reportados como protetores contra a morte celular isquêmica *in vivo* (Bischofberger, et al., 1997; Connick & Stone, 1989; Dalpiaz & Manfredini, 2002; Von Lubitz, et al., 1999) e *in vitro* (Goldberg, et al., 1988). Contudo, a cafeína e antagonistas adenosinérgicos A2a impedem a neurotoxicidade da β -amilóide em cultura cerebelar de ratos (Dall'Igna, et al., 2003). Além disso, em modelo animal de doença de Parkinson, a administração de

antagonistas de receptores A2a protegeu contra a perda de neurônios dopaminérgicos da substância nigra, induzida por 6-hidroxi-dopamina em ratos, prevenindo também a perda dos terminais nervosos dopaminérgicos no estriado e a subsequente gliose causada por MPTP em camundongos (Ikeda, et al., 2002).

O sistema purinérgico incluindo a adenosina modula não só neurotransmissores, mas também sistemas de mensageiros secundários, metabolismo energético e diversos comportamentos, tais como, sono, atividade motora, agressividade, cognição, memória e interação social (Machado-Vieira, et al., 2002). A adenosina tem papel importante no aprendizado e memória (Zarrindast & Shafaghi, 1994; Ohno & Watanabe, 1996) pela regulação da transmissão sináptica, excitabilidade neuronal (Sebastião & Ribeiro, 2000; Kaplan & Abel, 2003) e plasticidade sináptica neuronal incluindo processos de potenciação de longo-prazo¹ (LTP) (de Mendonça & Ribeiro, 1994; Kessey, et al., 1997; Tabata, et al., 2001) e de depressão de longo-prazo² (LTD) (de Mendonça, et al., 1997; de Mendonça & Ribeiro, 1997), os quais estão implicados em certas formas de aprendizado e memória (Errington, et al., 1987; Collingridge & Bliss, 1995). Estudos prévios têm demonstrado que agonistas de receptores de adenosina impedem o aprendizado e a memória (Normile & Barraco, 1991; Normile, et al., 1994; Zarrindast & Shafaghi, 1994; Ohno & Watanabe, 1996), enquanto antagonistas facilitam esses processos, em roedores (Nehlig, et al., 1992; Suzuki, et al., 1993; Kopf, et al., 1999; Pereira, et al., 2002; Angelucci, et al., 1999; Hauber & Bareiss, 2001; Angelucci, et al., 2002). Há ampla evidência para o papel modulatório da adenosina na memória no hipocampo, bulbo olfatório e estriado (de Mendonça & Ribeiro, 1994; Kessey, et al., 1997; de Mendonça & Ribeiro, 2000; Tabata, et al., 2001). Ao mesmo tempo, vários estudos apontam antagonistas adenosinérgicos como reforçadores cognitivos (Pitsikas & Borsini, 1997; Jin, et al., 2000; Fraser, et al., 1997; Fredholm, 1995; Prediger & Takahashi, 2005; Prediger, et al., 2005a,b; Casas, et al., 1989, 1999; Arendash, et al., 2006; Dall'Igna, et al., 2003, 2007).

De acordo com a revisão de Daly (2007), os receptores de adenosina A1 são inibitórios da adenil-ciclase (Londos & Wolff, 1977; Van Calker, et al., 1979) e de alguns tipos de canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem (canais N e Q), além da ativação de vários tipos de canais de K⁺ e de fosfolipases C e D. Enquanto os receptores A2 são estimuladores da adenil-ciclase e, possivelmente, também ativam alguns tipos de canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem, especificamente, o tipo L (Fredholm, et al., 1994, 1995).

Os primeiros são vistos como tendo papel chave na neuroproteção por reduzir a liberação de glutamato e hiperpolarizar neurônios. Sua ativação no início da lesão neuronal atenua o dano, ao mesmo tempo em que seu bloqueio exacerba o dano em animais adultos. Ocorre ainda uma subsensibilidade desses receptores, em estado tóxico crônico. Em contraste, há uma supersensibilidade de receptores A2a em condições nocivas crônicas e seu bloqueio confere robusta neuroproteção cerebral em animais adultos, como em estudos com modelos de Parkinson e Alzheimer (ver revisão de Cunha, 2005).

O mais evidente efeito da adenosina para o controle de circuitos neuronais é sua habilidade de deprimir a transmissão sináptica excitatória por meio da ativação de receptores A1 (ver revisão de Fredholm, et al., 2005). A ativação tônica de receptores A1 por adenosina endógena restringe a potenciação de longo-prazo¹ (de Mendonça & Ribeiro, 1990), depressão de longo-prazo² e depotenciação³ (de Mendonça & Ribeiro, 1994; de Mendonça, et al., 1997). Tal habilidade referida ao receptor A1 para conter a plasticidade e é similar ao seu controle na transmissão sináptica (ver revisão de Fredholm, et al., 2005). Dessa forma, esse sistema funciona como um sistema inibitório da plasticidade, evitando o surgimento de sinais irrelevantes ou sub-limiares em circuitos neurais. Por outro lado, a ativação de receptores A2a pela adenosina endógena parece ser seletivamente engajada na implementação de potenciação de longo-prazo¹ tanto em sinapses estriatais como hipocámpais (d'Alcântara, et al., 2001; Cunha, 2008). Estudo recente mostrou que a potenciação de longo-prazo¹ de correntes sinápticas mediadas por NMDA entre fibras musgosas e células piramidais CA3 depende de receptores de adenosina pós-sinápticos A2a (Rebola, et al., 2008). As ações psicoestimulantes da cafeína são atribuídas ao bloqueio de receptores A1 e A2a, entretanto, dados recentes mostram que os efeitos excitatórios bem como neuroprotetores parecem ser devido ao bloqueio preferencial de receptores A2a (Dall'Igna, et al., 2003; Higgins, et al., 2007; Huang, et al., 2005; Silva, et al., 2007). No hipocampo, a ação de receptores A2a atenua a habilidade de agonistas de receptores A1 para inibir excitabilidade e transmissão sináptica (Schwarzschild, 2006; Cestari & Castellano, 1996). O que reforça a taxa de disparo de aferentes colinérgicos dentro do hipocampo, os quais, por sua vez, têm papel chave no controle de processos cognitivos como atenção e memória (Hasselmo & Giocomo, 2006). A influência de receptores A2a sobre interneurônios também pode afetar processos cognitivos dependentes de

hipocampo, por meio da exacerbação da taxa de disparo neuronal. Dessa forma, a cafeína poderia induzir excitação do sistema por meio de correntes mediadas por NMDA, tendo papel de auxiliar na sobrevivência e na integração de novos neurônios ao circuito hipocampal.

O estudo de Epstein et al. (2004) revelou que baixas concentrações de cafeína agem como moduladores do processo celular ao reduzir o potencial de membrana de neurônios tratados previamente, corroborando o fato da cafeína exibir propriedades neuronais plásticas e estar implicada com a formação de memórias. Por outro lado, trabalhos recentes mostram que ocorre supressão da proliferação (Kochman, et al., 2009; Han, et al., 2007) e sobrevivência de novos neurônios gerados no giro denteado adulto (neurogênese; Wentz & Magavi, 2009). Isso parece contradizer os efeitos benéficos da cafeína sobre a memória ao promover a sinaptogênese (Korkotian & Segal, 1999) e o aumento do potencial de longa duração hipocampal (Arai, et al., 1990), necessitando de melhores esclarecimentos a cerca desses fatos.

1.2. Memória episódica e tarefas de reconhecimento de objetos

Memória episódica se refere à recordação consciente de experiências pessoais. É a junção de três elementos referentes a uma recordação: o quê aconteceu, onde e quando o evento foi vivido. Esse tipo de memória requer consciência autoconsciente e senso de tempo subjetivo (Tulving, 2002). Tem sido proposto que animais não-humanos são desprovidos de senso de subjetividade de tempo e poderiam somente lembrar os fatos de um evento passado (memória semântica), enquanto seriam incapazes de lembrar fatos de experiências pessoais (Yonelinas, 2002; Roberts, 2002; Tulving, 2002; Suddendorf & Corballis, 1997). Contudo, outros autores (Menzel, 1999; Donald, 2001; Griffin & Speck, 2004; Hampton, 2001; Fortin, et al., 2004) têm proposto que esses animais possuem uma forma implícita de memória episódica, tendo, portanto, habilidades para integrar e lembrar os elementos “o quê, quando e onde” de eventos pessoais, o que pode ser inferido de seus comportamentos. Sendo assim, modelos animais de memória episódica têm sido utilizados em investigações anatômicas, farmacológicas, fisiológicas, genéticas e moleculares, não aplicáveis a humanos (revisão de Dere, et al., 2006).

A primeira tarefa utilizada em animais com o objetivo de avaliar a integração desses elementos foi aplicada por Clayton & Dickinson (1998), em pássaros (corvídeos) submetidos a uma tarefa com intervalo de tempo para avaliar se eles eram capazes de recordar onde foi escondida ração ou larva. Tais pássaros preferem as larvas, porém estas são mais palatáveis apenas quando o intervalo entre o treino e o teste é curto, pois após um longo intervalo, as larvas apodrecem e eles escolhem os lugares onde aprenderam que há ração. Outra tarefa, nesse sentido, para avaliar os três componentes da memória episódica foi desenvolvida por Ergorul & Eichenbaum (2004) com ratos. Estes, depois de repetidos treinos, foram capazes de lembrar uma série de odores presentes em diferentes lugares, usando uma combinação do elemento olfativo (o quê) ao espacial (onde estava determinado odor) para distinguir quando foram apresentados.

Babb & Crystal (2005, 2006 a,b) desenvolveram tarefa em labirinto radial para ratos, baseada no estudo de Clayton & Dickinson (1998). Na fase de amostra, apresentaram quatro braços inacessíveis e outros quatro com chocolate. Na sessão teste, os animais eram re-expostos ao labirinto e os braços anteriormente fechados, continham agora, ração, enquanto os que continham chocolate continuavam a contê-los. Os animais preferiram os braços com alimentos mais palatáveis (chocolate), indicando recordação do evento.

Fortin, et al. (2004) demonstrou em tarefa de discriminação de odores, usando ratos com hipocampo lesionado e animais não-lesionados, que a memória de reconhecimento em ratos, similar a humana, é baseada em memória tipo-recordação e tipo-familiaridade e, que o hipocampo é seletivamente envolvido na primeira. Baseado nesses achados propõe-se que a validade de modelos animais de memória episódica seja avaliada pela sensibilidade hipocampal a lesões (Ergorul & Eichenbaum, 2004). A memória tipo-recordação em ratos para localizações de diferentes objetos foi desenvolvida como uma tarefa de exploração de objeto novo. Eacott, et al. (2005) desenvolveram uma tarefa em que ratos são apresentados a um objeto já conhecido e a um novo, sendo o primeiro apresentado em contexto diferente. Assim os animais exploram mais o objeto novo, pois recordam o objeto antigo, previamente apresentado em outro contexto.

Kart-Teke e colaboradores (2006) desenvolveram uma tarefa que não requer privação de água ou alimentos, nem necessita de treinos extensivos que pudessem corroborar para a recordação, seja como motivação para busca de alimento ou água, ou ainda, como repetição que levasse ao aprendizado da regra com formação de memória do fato, sem recordação dos elementos o quê, quando e onde (memória semântica - Bird, et al., 2003; Gaffan, 1994; Hampton & Schwartz, 2004). Nessa tarefa, diferentes versões de preferência pela novidade são combinadas para medir a memória de reconhecimento de objetos (Ennaceur & Delacour, 1988), a memória para localizações nas quais os objetos são explorados (Ennaceur, et al., 1997) e a ordem temporal da apresentação dos objetos (Mitchell & Laiacona, 1998). Foi visto que camundongos são capazes de integrar as informações o quê, quando e onde de experiências únicas. Avaliações farmacológicas nesse modelo também são possíveis (Dere, et al., 2005a, b; Barbosa, et al., 2010), por exemplo, o uso de agonista NMDA, D-cicloserina, teve efeito proméstico nessa tarefa (Kart-Teke, et al., 2006). A tarefa clássica de exploração de objetos consiste de uma sessão de amostra, na qual os ratos ou camundongos exploram dois objetos iguais, após um intervalo de tempo, segue-se uma sessão teste em que são apresentados um objeto familiar e um novo. Os animais gastam mais tempo explorando o objeto novo, indicando que o objeto familiar foi reconhecido (Ennaceur & Delacour, 1988). Uma modificação desse paradigma permite medir a memória para localizações. São apresentados na sessão de teste, dois objetos familiares, um em uma nova posição e o outro na antiga posição, como encontrado na sessão de amostra. Assim, os animais gastam mais tempo explorando o objeto posto em nova localização (Ennaceur, et al., 1997). Outra variante do paradigma de preferência por novidade mede a memória para ordem temporal, na qual dois diferentes objetos são apresentados no passado. Essa versão é composta de três sessões: duas sessões de amostra, com intervalo de uma hora entre elas e, uma sessão de teste, cujo intervalo pode variar (Dere, et al., 2005a, b; Kart-Teke, et al. 2006; Barbosa, et al. 2010). Nas sessões de treino, duas ou quatro cópias de um mesmo objeto são apresentadas em localizações distintas em cada amostra. Em cada amostra, os objetos são os mesmos entre si, mas diferem em localização e aspecto de uma amostra para outra. Durante a fase de teste, dois ou quatro objetos são apresentados, tanto os da primeira amostra como da segunda, os quais podem ou não estar deslocados. Dessa forma, os animais exploram mais os objetos mais antigos apresentados (primeira amostra) e ainda, tendem a explorar mais o antigo deslocado em

relação ao não-deslocado. Isso indica que os animais discriminam os objetos em termos de recência relativa (Mitchell & Laiacina, 1998; Ennaceur & Delacour, 1988) e de localização (Ennaceur, et al., 1997; Dere, et al., 2005a, b; Kart-Teke, et al., 2006; Barbosa, et al., 2010).

Em tarefas de localização espacial, diferindo a distância entre objetos, afastando-os ou aproximando-os, ratos com lesões no giro denteado tiveram maior prejuízo em localizações mais próximas, bem como, nenhum déficit em separação espacial aumentada. De forma diretamente proporcional, quanto maior a distância entre os objetos, melhor a discriminação (Gilbert, et al., 2001). Ratos com giro denteado lesionado foram testados em tarefa de ordem temporal de localização espacial. Verificou-se que ratos lesionados tiveram padrão de preferência do objeto apresentado mais antigo no tempo, quando os objetos foram apresentados na disposição mais afastada; enquanto, tiveram prejuízo na recordação temporal, preferindo o mais recente, quando a separação espacial foi mais próxima. Isso sugere dificuldade de separação de padrões⁴ em níveis de alta interferência (Hunsaker & Kesner, 2008).

A memória de longo-prazo pode ser avaliada em tarefas nas quais a sessão teste é uma nova situação, que não pode ser antecipada pelos animais. Dessa forma, é requerida uma recordação retrospectiva da memória, o que caracteriza a memória tipo-episódica em animais por critério comportamental. Em humanos, déficits em memória episódica são encontrados após danos ao lobo temporal medial, o hipocampo, o córtex frontal e corpos mamilares no diencéfalo (Aggleton & Brown, 1999). Quanto a estudos de memória de objetos em animais, o hipocampo tem se mostrado crítico para associações objeto-lugar (Gilbert & Kesner, 2004; Mumby, et al., 2002), mas possivelmente, não está implicado em memória de reconhecimento do objeto em si, o qual depende do córtex perirrinal (Winters & Bussey, 2005). A ordem temporal para objetos é mediada pelo córtex pré-frontal medial (Chiba, et al., 1994; Hannesson, et al., 2004). É possível que a neuroplasticidade de receptores NMDA no córtex perirrinal, hipocampo e córtex pré-frontal suporte a memória episódica em humanos e a tipo-episódica em roedores. NMDA está implicado em certos tipos de plasticidade sináptica de longo-prazo e consolidação de memória (Martin & Morris, 2002). Receptores NMDA estão envolvidos em reconhecimento de objetos, objeto-lugar e memória de ordem temporal. O uso de antagonistas tem mostrado prejuízos em tarefas de

reconhecimento de objetos (De Lima, et al., 2005), associações objeto-lugar (Mandillo, et al., 2003) e ordem temporal (Long & Kesner, 1995). Agonistas de NMDA, como DCS (D-cicloserina), reforça a cognição em ratos normais; melhora ou reverte o prejuízo promovido por estresse de injeção e auxilia o desempenho em memória tipo-episódica (Kart-Teke, et al., 2006). Agonistas desse receptor tem efeitos promnésticos em diversas tarefas de aprendizado, em ratos e camundongos (Hughes, 2004; Land & Riccio, 1999; Lelong, et al., 2001; Matsuoka & Aigner, 1996; Pussinen & Sirvio, 1999; Quartermain, et al., 1994; Kart-Teke, et al. 2006); reverte déficit promovido por anticolinérgicos (Ohno & Watanabe, 1996; Pitkanen, et al., 1995; Zajackowski & Danysz, 1997), alivia déficits de lesões hipocampais (Schuster & Schmidt, 1992), reverte prejuízos associados à idade (Baxter et al., 1994) e à doença de Alzheimer (Schwartz, et al., 1996; Tsai, et al., 1999).

O lobo temporal medial incluindo a formação hipocampal (córtex entorrinal, giro denteado, áreas CA1-4 e subiculum), amígdala e córtices perirrinal e pós-rinal, servem como um sistema de memória declarativa (Buffalo, et al., 1999; Squire, et al., 2004). Eichenbaum e colaboradores (1994, 1996, 1997) propõem que diferentes partes do lobo temporal medial suportam diferentes aspectos da memória declarativa (semântica e episódica). O sistema cortical codifica representações não relacionadas, individuais, nas quais o hipocampo subsequentemente organiza para criar representações relacionadas acessíveis, permitindo inferências a serem usadas em novas situações. A região parahipocampal (córtices entorrinal, parahipocampal e perirrinal) está implicada em várias rotas de entradas corticais e permite representações temporais. De acordo com Eichenbaum (1997), o hipocampo sustenta a habilidade para distinguir entre episódios únicos e para integrar a informação extraída desses episódios dentro do conhecimento semântico. O hipocampo tem a função de suportar a rede de memórias corticais.

O hipocampo está envolvido em recordação e memória episódica, enquanto outras estruturas do lobo temporal medial, como córtex perirrinal sustentam a memória baseada em familiaridade e memória semântica (Tulving & Markowitsch, 1998; Aggleton & Brown, 1999; 2006; Brown & Aggleton, 2001). Lesões hipocampais em humanos, como o famoso caso H.M. (Scoville & Milner, 1957) corroboram a idéia de que o hipocampo e o lobo temporal medial são necessários para aquisição e

consolidação de memória episódica. Lesões na matéria branca em macacos (Gaffan, et al., 2001) e em pacientes como H.M. com amplo dano ao lobo temporal medial (Scoville & Milner, 1957) prejudicam a modulação colinérgica do hipocampo e regiões relacionadas. A perda de fibras colinérgicas, devido a lesões (Easton, et al., 2002, Gaffan, et al., 2001), que inervam o hipocampo e o córtex temporal inferior prejudica o aprendizado de tarefa episódica, conduzindo à proposta de que a inervação colinérgica é essencial para memória episódica normal (Easton & Parker, 2003; Easton, et al., 2002; Parker, et al., 2002). A acetilcolina é necessária para novo aprendizado, pois estimula, por exemplo, a potenciação de longo-prazo¹ nas sinapses da rede colateral recorrente de CA3 (Hasselmo, 1995).

Tarefas de memória tipo-episódica em roedores requerem que os componentes “o que, quando e onde” estejam ligados em um episódio único durante a consolidação, para permitir a recordação de todos os três elementos no teste. A apresentação de um componente pode ser suficiente para a recordação do episódio completo. O hipocampo processa informação espacial (células de lugar⁵) e temporal independentemente (Kesner, 1998; O’Keefe & Nadel, 1978). Nesse sentido, sub-regiões hipocâmpais têm sido associadas a diferentes componentes da memória episódica: o componente “o quê” tem sido associado com a função do giro denteado; “onde” tem sido associado a CA3 e “quando” a CA1. Assim o loop trissináptico do hipocampo parece estar envolvido no desenvolvimento da memória tipo-episódica, pois processa episódios comportamentais. Sugere-se que o giro denteado não está envolvido na formação de memória episódica *per se*, mas é responsável pela separação de contextos espaciais similares, sendo essencial para a recordação e discriminação entre episódios. CA3 parece mais envolvida com os aspectos do processamento espacial, relacionados ao ordenamento temporal (Kesner & Hunsaker, 2010). CA1 tem algum envolvimento espacial, mas é principalmente envolvida no processamento temporal, sendo responsável pela estocagem temporal de um evento separadamente de outro (Estes, 1985).

Tem sido proposto que o giro denteado e CA3 interagem via fibras musgosas para o processamento da informação espacial com alta resolução (Morris & McNaughton, 1987; Rolls & Treves, 1998; Rolls & Kesner, 2006). Além disso, o giro denteado é responsável pela mediação de separação de padrões⁴ de espaços similares, mecanismo necessário para detecção de pequenas mudanças (novidades) no meio. CA3,

por sua vez, é responsável por mediar um processo similar de separação de padrões⁴, mas em escala espacial muito maior, ou seja, é capaz de detectar mudanças geométricas gerais no meio (Rolls & Treves, 1998). Tem sido demonstrado que a sub-região hipocampal CA1 dorsal medeia o processamento temporal da informação; CA3 dorsal participa do processamento espaço-temporal da memória ou completção de padrões⁶ (Rolls & Treves, 1998; Gilbert & Kesner, 2006; Gilbert, et al., 2001) e o giro denteado dorsal, a separação de padrões⁴ espaciais (Gilbert et al., 2001; Hunsaker & Kesner, 2008). Dados recentes do nosso grupo avaliando as diferentes regiões hipocampais em tarefa de memória tipo-episódica que envolve os três componentes simultaneamente (adaptada de Dere, et al., 2005a; b) revelou a função diferencial dessas regiões na aquisição. Animais controle mostraram discriminação espaço-temporal. Animais com inativação farmacológica com muscimol no giro denteado/CA3 mostraram prejuízo na discriminação espacial, enquanto a temporal foi preservada. Quando a inativação foi realizada em CA1, os animais exploraram igualmente todos os objetos, sem discriminação temporal ou espacial. Esses resultados corroboram estudos de modelos computacionais em que giro denteado/CA3 têm papel na separação de padrões⁴ espaciais, enquanto CA1 é responsável pela consolidação de episódios mnemônicos múltiplos (Barbosa, et al., no prelo).

Nos últimos anos, o paradigma de reconhecimento de objetos tem sido amplamente usado para testar efeitos de intervenções farmacológicas e genéticas na memória de reconhecimento (Bertaina-Anglade, et al., 2006; Heldt, et al., 2007). Esse tipo de tarefa consiste em quantificar o comportamento natural dos roedores de exploração de objetos novos em detrimento de antigos, apropriando-se da motivação natural dos animais em explorar a novidade, um instinto inato para o aprendizado do ambiente (Ennaceur & Delacour, 1988). Contudo, as bases anatômicas sobre os processos exatos que envolvem a memória de reconhecimento ainda permanecem sobre investigação (Costa, et al., 2008a).

A maioria dos efeitos benéficos da cafeína foi investigada em tarefas com componentes aversivos ou de reforço (Angelucci, et al., 2002; Kopf, et al., 1999; Prediger, et al., 2005). Já tarefas que envolvem o comportamento natural dos animais para avaliar o aprendizado e a memória são pouco exploradas.

1.3. Neurogênese

A neurogênese adulta é um processo que gera novos neurônios a partir de células-tronco neurais ou populações de células progenitoras em áreas limitadas do cérebro, envolvendo os seguintes processos: proliferação de células progenitoras ou células-tronco; migração dessas células geradas; diferenciação em tipos neuronais específicos e integração ao circuito neural. As células-tronco ou progenitoras com características de multipotência e auto-renovação indiferenciada residem na zona subventricular, ao longo das paredes dos ventrículos laterais e na zona subgranular do giro denteado do hipocampo (Gage, 2000; Lie, et al., 2004). Novos neurônios nascidos nessas áreas germinativas migram para o bulbo olfatório (Alvarez-Buylla & Nottebohm, 1988; Lois & Alvarez-Buylla, 1994) e a camada granular do giro denteado (Kaplan & Bell, 1984), respectivamente, onde se diferenciam e incorporam ao circuito pré-existente. O hipocampo é tido como responsável por mediar várias formas de memória e aprendizado (Burgess, et al., 2002; Scoville & Milner, 1957; Squire, 1987) e tem-se tentado estabelecer uma ligação entre a neurogênese adulta e a manutenção ou reforço de habilidades cognitivas (Deng, et al., 2010). Novos neurônios gerados no giro denteado são necessários para o aprendizado de tarefas espaciais, mediando o processo de separação de padrões⁴ e a memória de tarefas dependentes de hipocampo (Imayoshi, et al., 2008; Clelland, et al., 2009; Snyder, et al., 2009a,b,c; Ramirez-Amaya, et al., 2006).

Vários trabalhos mostraram que novos neurônios gerados no giro denteado adulto formam conexões sinápticas e se integram ao circuito hipocampal. Recebem entradas sinápticas da via perforante como mostrado morfológicamente (Tronel, et al., 2010; Zhao, et al., 2006) e eletrofisiologicamente (Ge, et al., 2007; Ambrogini, et al. 2009; Ge, et al. 2006; Espósito, et al., 2005). Novos neurônios mostram expressão de genes imediatos em respostas a aspectos específicos da estimulação comportamental (Kee, et al., 2007; Trouche, et al., 2009; Epp, et al., 2011; Jessberger & Kempermann, 2003) e contribuem para a potenciação de longo-prazo¹ em nível populacional (Snyder, et al., 2001; Saxe, et al., 2006; Garthe, et al., 2009; Wang, et al., 2008). Estudos com traçadores retrógrados (Stanfield & Trice, 1988; Hastings & Gould, 1999; Toni, et al., 2008) e investigações morfológicas (Zhao, et al., 2006; Toni, et al., 2008; Faulkner, et al., 2008) também sugerem que eles formam sinapses eferentes funcionais. Estudos com

expressão de canal rodopsina estimulados pela luz em novos neurônios mostram a formação de correntes pós-sinápticas excitatórias em CA3 (Toni, et al., 2008). Trabalhos com expressão de genes imediatos (Guzowski, et al., 2006; Guzowski, et al., 1999) e eletrofisiológicos (Leutgeb, et al., 2007; Hastings & Gould, 1999; Lacefield, et al., 2010; Buzsáki, 2002) evidenciam que novos neurônios são responsáveis por representar e codificar informações comportamentais. Além disso, neurônios jovens ou maduros são ativados por diferentes aspectos da experiência (Aimone, et al., 2006; Piatti, et al., 2011). Essa especialização dependente de experiência é importante para garantir que populações de neurônios respondam a características de novos meios ou a novas características. Novos neurônios são ativados preferencialmente por entradas codificadas durante seu desenvolvimento (Kee, et al., 2007; Tashiro, et al., 2007; Aimone, et al., 2011).

Estudos comportamentais mostram que ratos com lesões no giro denteado, mas não em CA1 mostraram déficit na discriminação espacial de objetos de forma dependente da distância entre eles (Gilbert, et al., 2001). Camundongos transgênicos com plasticidade prejudicada no giro denteado foram incapazes de distinguir contextos semelhantes (McHugh, et al., 2007). Tais evidências sugerem o giro denteado como responsável pela separação de memórias formadas no hipocampo e, a neurogênese parece ter papel importante nessa função (Clelland, et al., 2009; Sahay, et al., 2011). Propõe-se que a plasticidade de neurônios jovens entre populações funcionais distintas em diferentes tempos, potencialmente melhora a separação de padrões⁴ ao longo do tempo (Aimone, et al., 2006; Becker & Wojtowicz, 2007).

Neurônios gerados na vida adulta passam por robustas mudanças na morfologia, expressão de canais iônicos, resposta a neurotransmissores e outras propriedades intracelulares críticas ao longo do seu desenvolvimento (Ge, et al., 2008; Mongiat & Schinder, 2011). Todos esses fatores afetam sinalização intracelular e entre células e, interações entre neurônios adultos e o meio provavelmente dependem do estágio celular de maturação. A despolarização gabaérgica em neurônios imaturos (Ben-Ari & Spitzer, 2004; Owens & Kriegstein, 2002) inicialmente serve como mecanismo para promover diferenciação, migração e maturação desses neurônios no giro denteado (Ge, et al., 2006; Tozuka, et al., 2005; Ge, et al., 2007; Jagasia, et al., 2009). Níveis elevados de GABA dentro da região neurogênica levam tanto à inibição de neurônios mais antigos, quanto promove o crescimento de neurônios nascidos recentemente.

Atividade neuronal regula a sobrevivência de novos neurônios de forma dependente de receptores NMDA (Tashiro, et al., 2006). Optogenética e análises farmacológicas têm demonstrado que células granulares do giro denteado liberam glutamato somente quando maduras (Toni, et al., 2008). Nesse período, a polaridade de respostas gabaérgicas muda de excitação para inibição (Ge, et al., 2006). Entre quatro e oito semanas após o nascimento, novos neurônios de camundongos adultos exibem aumento na arborização dendrítica e número de espinhas dendríticas, bem como refinamento de terminais axonais e maturação dos botões sinápticos das fibras musgosas (Faulkner, et al., 2008; Zhao, et al., 2006). Esse é o período no qual, novos neurônios exibiriam propriedades plásticas únicas, tais como, um menor limiar e maior amplitude para indução de potenciação de longo-prazo¹, em comparação aos neurônios perinatais ou em estágios mais maduros. Suas propriedades plásticas são mediadas por receptores do tipo NMDA contendo NR2B, sendo insensíveis à inibição gabaérgica, enquanto supressão da transmissão gabaérgica é requerida para LTP¹ em neurônios maduros (Ge, et al., 2008; Ge, et al., 2007; Snyder, et al., 2001). Tal facilitação transiente em novos neurônios adultos poderia levar à conectividade entre eles, promovendo uma contribuição única para o processamento da informação no giro denteado; além disso, tem uma vantagem na competição com neurônios maduros para estabilidade de conexões sinápticas aferentes e eferentes (Tashiro, et al., 2006; Toni, et al., 2007).

Uma nova população de neurônios nascidos poderia estar, portanto, envolvida na discriminação de eventos, codificando novas experiências. Tem sido proposto também que tais neurônios poderiam ter um papel na integração temporal de eventos que são próximos. Acredita-se que a discriminação de eventos similares possa ser decorrente da associação de um evento com uma população de neurônios novos em um estágio distinto de maturação (Deng, et al., 2010; Aimone, et al., 2010).

O impacto do neurogênese aumentada no comportamento parece ser dependente da tarefa, havendo um efeito positivo consistente na sobrevivência de novos neurônios nascidos durante um tempo restrito antes da exposição a aprendizado explícito, exercício ou enriquecimento ambiental. Apesar de neurônios com cinco semanas já expressarem marcadores neuronais, a plasticidade sináptica é ainda maior que no circuito de neurônios maduros pré-existentes (Ge, et al., 2007). Novos neurônios seriam seletivamente envolvidos na codificação de eventos individuais e também afetariam a

organização de traços de memória, sendo ambos os processos provavelmente devido ao reforço na plasticidade dos neurônios novos.

Segundo Aimone, et al. (2009), as memórias episódicas são mais vulneráveis a degradação ou esquecimento sem a contribuição de novos neurônios. Propriedades eletrofisiológicas de novos neurônios sugerem integração sináptica e, essa habilidade para expressar plasticidade é mais adequada à integração que a separação de estímulos dentro do giro denteado. Sucessivas populações de novos neurônios, transitoriamente expressam propriedades plásticas e codificam memórias separadas, permitindo a separação de padrões⁴ espaço-temporais, seguindo o crescimento neuronal e a maturação (Becker & Wojtowicz, 2007). A neurogênese pode melhorar a habilidade da rede para estocar e recordar informações tanto por substituição (Becker, 2005) como por adição de novos neurônios (Weisz & Argibay, 2009). Autores sugerem que os neurônios amplamente sintonizados são os novos neurônios adultos nascidos, sendo os antigos retirados da rede (Alme, et al., 2010). O processo pode ser tido como a alteração de neurônios disponíveis para codificar memórias, de modo que a nova informação é codificada diferentemente da antiga, reduzindo a interferência e aumentando a separação das informações ao longo do tempo. Neurônios antigos são responsáveis por codificar características similares a memórias familiares e novos neurônios tendem a ser mais adequados para codificação de novas características, as quais são menos representadas pelos antigos neurônios da rede (Aimone & Gage, 2011).

É possível que a função diferencial no comportamento, entre neurônios jovens e maduros, se dê mesmo após o desenvolvimento dos primeiros. Estudos mostram que a citoarquitetura dendrítica de neurônios jovens nascidos posteriormente a outros é diferente de maduros mais antigos (Desmond & Levy, 1982; Green & Greenough, 1986; Claiborne, et al., 1990; Redila & Christie, 2006), localizados mais profundamente na camada celular granular. Como os dendritos tem papel na integração e processamento de informação (Sjostrom, et al., 2008; Branco & Hausser, 2010), tais diferenças morfológicas podem suportar diferenças permanentes na maneira de células adultas recém-geradas contribuírem para o comportamento.

O circuito hipocampal é caracterizado por sua complexidade e redundância. A neurogênese adulta é tida como um mecanismo plástico adicional dentro do hipocampo, sendo parte integral do já rico e plástico circuito (ver revisão de Wojtowicz, 2012).

Estudos mostram que a neurogênese hipocampal pode ser regulada fisiológica (Imayoshi, et al., 2008; Clelland, et al., 2009; Snyder, et al., 2009a,b,c; Ramirez-Amaya, et al., 2006) e farmacologicamente (Han, et al, 2007, Wentz & Magavi, 2009), estando diretamente relacionada à memória (Shors, et al., 2001; Kempermann, et al., 1997). Fármacos podem aumentar ou reduzir a atividade sináptica tendo como consequência modificações no circuito neuronal, que por sua vez, alteram o desenvolvimento comportamental e funções cognitivas (Himmel, 2008). A neurogênese hipocampal pode ser regulada pela atividade neural sugerindo que o aprendizado induz a ativação de novos neurônios e, reforça a sua sobrevivência e incorporação dentro do circuito em tarefas dependentes de hipocampo (Gould, et al., 1999; Leuner, et al., 2006).

2. Justificativa

Considerando os efeitos neuronais plásticos da cafeína, os quais propiciam alterações eletrofisiológicas e morfológicas, e seu aspecto mnemônico positivo, em determinada faixa de dose, propomos a investigação de diferentes doses, em tratamentos agudo ou crônico. Temos o intuito de avaliar sua ação comportamental, bem como, a possibilidade de influenciar a sobrevivência de novos neurônios nascidos no giro denteado (neurogênese), sob a condição de tratamento crônico.

3. Objetivos

3.1. Geral

Avaliar os efeitos da cafeína sobre a memória do tipo episódica e verificar uma possível participação da sobrevivência neuronal no giro denteado.

3.2. Específicos

- Avaliar os efeitos da administração aguda e crônica de duas doses de cafeína sobre a memória do tipo episódica em duas tarefas de reconhecimento de objetos em ratos adultos.
- Analisar os efeitos da administração crônica de uma dose baixa ou elevada de cafeína sobre a sobrevivência neuronal no giro denteado (neurogênese).
- Estabelecer as relações entre o desempenho nas tarefas e o processo de sobrevivência neuronal decorrente do tratamento crônico com cafeína.

4. Materiais e métodos

4.1. Sujeitos Experimentais e Procedimentos Gerais

Os ratos foram criados no Laboratório de Estudos de Memória em Roedores da UFRN, alojados em grupos de cinco animais em gaiolas plásticas com dimensões de 30cm de comprimento x 37cm de largura x 16cm de altura e mantidos em ambiente com isolamento acústico e sob condições controladas de temperatura (25 ± 1 °C), umidade e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 6h). Os animais tiveram livre acesso à água e comida. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e da International Brain Research Organization (IBRO), na publicação Nº 85-23, revisada em 1985 do Instituto Nacional de Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. O nosso protocolo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da UFRN e a seguir foram executados os procedimentos experimentais (nº 021/2009).

Foram utilizados 45 ratos machos Wistar, com cerca de quatro meses de idade que receberam injeções agudas de cafeína 15mg/kg, cafeína 30mg/kg, ou salina, perfazendo respectivamente, os grupos experimentais de dose baixa e alta de cafeína e grupo controle. A administração aguda de droga ou veículo foi realizada 30 minutos antes dos treinos das tarefas para avaliar o efeito agudo da droga e o possível estresse do

procedimento de injeção. Foram também utilizados 18 ratos machos Wistar, com cerca de três meses de idade, sendo divididos em três grupos, de acordo com o tratamento farmacológico crônico de 45 dias (cafeína 15mg/kg ou 30mg/kg, ou ainda, salina). A idade de quatro meses dos animais no experimento com tratamento agudo se justifica pela necessidade de mimetizar as condições do tratamento crônico, pois os grupos nesse caso foram submetidos às tarefas, aproximadamente, nessa idade, o que nos permite uma comparação dos dados de ambos os tratamentos.

Os animais também passaram por sessões diárias de 5 minutos de manipulação, 5 dias antes do início das injeções, em ambos os tratamentos, bem como 3 dias antes do início das tarefas comportamentais, no caso do experimento com tratamento crônico. Esse procedimento visa reduzir o estresse e permitir o costume dos animais com o experimentador. Como forma de amenizar o trauma das injeções do tratamento crônico, os lados do peritônio foram revezados a cada dia de administração. Além disso, os animais foram alocados na sala onde ocorreram as injeções e experimentos com uma hora de antecedência para sua ambientação.

4.2. Tratamento farmacológico

O tratamento farmacológico foi procedido com cafeína, nas doses de 15mg/kg ou de 30mg/kg, ou salina, injetados intraperitonealmente, apenas uma vez (tratamento agudo), 30 minutos antes do início das sessões de treinos das tarefas, ou ainda, uma vez por dia durante 45 dias. Os animais foram pesados imediatamente antes de receber a injeção de droga ou veículo, no caso do tratamento agudo ou, a cada 5 dias para que a administração de fármacos fosse feita de acordo com seus pesos, durante o tratamento crônico.

A cafeína foi diluída em solução salina e sob aquecimento. As soluções de cafeína ou veículo foram injetadas a um volume de injeção de 2 ml/kg, portanto, a concentração das soluções de cafeína correspondiam a 7,5 mg/ml e 15mg/ml para as doses de 15mg/kg e 30mg/kg, respectivamente, em ambos os tratamentos. O BrdU (5-bromo-2-deoxiuridina) foi injetado apenas nos grupos submetidos ao tratamento crônico para posterior análise histológica, a um volume de injeção de 2ml/kg, com concentração de 25mg/ml, diluído em salina, sob aquecimento, resultando em dose final de 50mg/kg,

injetada intraperitonealmente, nos sete dias iniciais do tratamento. Tanto a cafeína como o BrdU foram obtidos da Sigma-Aldrich.

4.3. Tarefas comportamentais

Foram utilizadas duas tarefas comportamentais, de reconhecimento de objetos, sabidamente dependentes do hipocampo (Barbosa, et al., no prelo; Hunsaker & Kesner, 2008).

A primeira tarefa foi adaptada de Dere, et al. (2005a;b) estendendo-se o intervalo entre os treinos e o teste de uma hora, como na tarefa original, para 24 horas, com o intuito de realizar manipulações farmacológicas (Barbosa, et al., 2010). Essa tarefa consiste de quatro sessões: uma de habituação, no primeiro dia da tarefa; duas sessões de treino, no dia seguinte, com intervalo de uma hora entre elas; e uma sessão de teste, 24 horas após as sessões de treino. Cada sessão dura cinco minutos, exceto a habituação que dura dez minutos. A sessão de habituação consiste em expor os animais a um campo aberto circular (84cm de diâmetro e 32cm de altura) para reduzir a exploração do meio nas sessões seguintes. A primeira sessão de treino consiste em expor os animais a um conjunto de quatro cópias de um mesmo objeto em determinada disposição. O treino seguinte, uma hora depois, consiste em apresentar quatro cópias de objetos diferentes dos primeiros, em disposição também distinta. O teste, realizado 24 horas depois do segundo treino, consiste em apresentar duas cópias dos objetos do segundo treino, nas mesmas posições (B) e duas cópias do primeiro treino, um na mesma posição (A1) e outro em uma posição diferente (A2) daquela sessão. As sessões de treino e teste estão esquematizadas na figura abaixo:

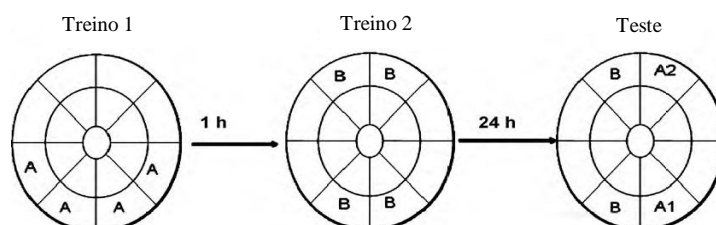


Figura 1: Esquema das sessões de treino e teste da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal. As letras A e B representam os objetos e suas posições no campo aberto.

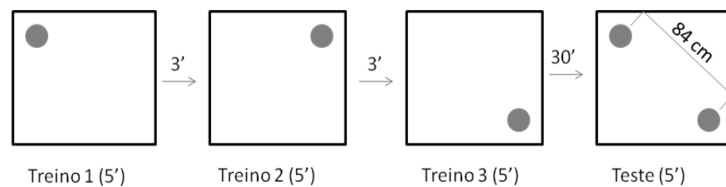
Nessa tarefa foram avaliados os seguintes parâmetros: os tempos e as taxas de exploração dos objetos recentes, antigos, antigo deslocado e não-deslocado, bem como a média do tempo e da taxa de exploração dos recentes. A taxa de exploração dos objetos é dada pela relação entre o tempo de exploração de cada objeto pelo tempo total ativo (que também pode ser descrito como a soma do tempo de exploração de todos os objetos). A taxa de exploração dos objetos recentes é dada pela soma dos tempos de exploração desses objetos dividida pelo tempo total de exploração de todos os objetos. Já a taxa média dos objetos recentes é dada pela relação entre a soma da taxa de cada objeto recente (obtido com a relação acima) dividida por 2. A taxa de exploração dos objetos antigos é dada pela soma dos tempos gastos na exploração de cada objeto antigo dividido pelo tempo total de exploração de todos os objetos. A taxa de exploração de cada objeto antigo deslocado ou não, por sua vez, é dada pela relação entre o tempo de exploração de cada objeto e o tempo total de exploração de todos os objetos. Foram avaliados ainda as taxas de discriminação de novidade que consistem na relação entre a diferença da taxa de exploração dos objetos antigos e da taxa dos recentes pela soma delas. Foram realizadas tanto as análises dos tempos e taxas de exploração para as sessões totais (cinco minutos dos treinos e teste), como para o primeiro minuto das sessões ou minuto a minuto.

Segundo Dere, et al. (2005a,b), essa tarefa avalia os aspectos o quê, quando e onde da memória episódica simultaneamente, aproveitando-se da exploração natural dos roedores pela novidade, sejam novos objetos (Barker, et al. 2007; Dix & Aggleton, 1999), ou novas localizações (Hannesson, et al., 2004). Portanto, na tarefa executada por nossos animais, haveria maior exploração dos objetos antigos (A) em relação aos recentes (B), e entre os antigos, o deslocado (A2) em relação ao não-deslocado (A1). Isso porque os objetos antigos foram apresentados há mais tempo, o que aumentaria a exploração dos animais em relação a objetos que foram apresentados mais recentemente; a novidade nesse caso se dá pela distância temporal entre as sessões. Já entre os objetos antigos, a atração pelo objeto A2 em relação ao A1 se dá pela novidade espacial associada àquele objeto.

A outra tarefa episódica realizada foi proposta por Hunsaker & Kesner, em 2008, para avaliar o aspecto temporal da memória em condições de alta e baixa interferência de padrões espaciais, realizada em campo aberto quadrado (75cm a cada lado e 40cm de altura). Essa tarefa compreende uma sessão de habituação, que dura dez

minutos; três treinos de cinco minutos cada, intervalados por três minutos, nos quais um mesmo objeto é apresentado em lugares diferentes do campo e, um teste, também de cinco minutos, realizado 30 minutos após o terceiro treino, em que são postos duas réplicas do objeto nas posições do primeiro e terceiro treinos. Nessa tarefa foram avaliadas as taxas de exploração dos objetos nas posições antiga e recente, bem como a taxa de discriminação, no teste, tanto para a sessão total de cinco minutos, como minuto a minuto. A taxa de exploração é dada pela relação entre o tempo de exploração de um dos objetos e a soma do tempo de exploração total (tempo ativo). Enquanto a taxa de discriminação é a relação entre diferença de tempo de exploração do objeto na posição antiga e na recente pelo tempo ativo total. Foram também vistos os tempos ativos que avaliam a exploração dos dois objetos na sessão de teste e de cada objeto nas sessões de treino. A tarefa compõe-se de duas condições, correspondentes a disposição dos objetos na sessão de teste: baixa interferência (sendo 84 cm a distância entre os objetos) e alta interferência (na qual os objetos distam 42cm entre si). As sessões de treinos e teste estão esquematizadas na figura abaixo, para ambas as condições:

A)



B)

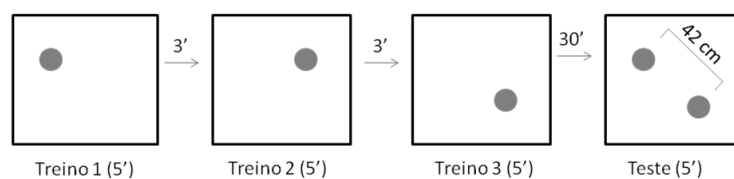


Figura 2: Tarefa de ordem temporal para localizações espaciais. A) Condição de baixa interferência. B) Condição de alta interferência.

A tarefa proposta por Hunsaker & Kesner (2008) foi desenvolvida para avaliar a separação de padrões espaciais em animais com lesão do giro denteado. Animais

lesionados não conseguem discriminar os objetos na condição de alta interferência (maior dificuldade de separação de padrões espaciais), não havendo, portanto, preferência pelo objeto apresentado na posição mais antiga temporalmente. Embora esses mesmos animais consigam apresentar o padrão esperado de preferência pela primazia na condição de baixa interferência (menor dificuldade).

Em ambas as tarefas e condições, em todas as sessões, foram avaliadas as distâncias percorridas, tanto considerando a sessão total de dez minutos (habituação) ou cinco minutos (treinos e teste), como minuto a minuto. Ainda na habituação foram avaliados os tempos gastos por zona do campo aberto (zonas externa e interna) para avaliar a ansiedade nos animais. As taxas de exploração e de discriminação, nas tarefas e condições também foram avaliadas, porque elas indicaram relações entre os tempos de exploração. Tais taxas exibiram uma porcentagem de exploração, a qual indicaria se a exploração se deu ao acaso (quando a relação se situava próximo de zero) ou se havia discriminação entre os objetos (quando o valor da relação se afastava de zero), bem como, diferenças individuais e entre grupos.

Os objetos utilizados possuíam de 10 a 20 cm e eram de material plástico de diferentes formas, texturas e cores, contendo cimento em seu interior para evitar o deslocamento pelos animais, bem como eram distribuídos aleatoriamente entre eles. Os objetos não possuíam significado etiológico para os animais e estudos pilotos averiguaram que não houve preferência entre os objetos utilizados, havendo discriminação entre eles. Tanto os objetos quanto os aparatos foram limpos com solução de álcool 5% entre as sessões e de um animal para outro. As sessões experimentais foram registradas em vídeo e os parâmetros comportamentais calculados por programa de rastreamento de animais (ANY-maze, Stoelting, USA). As avaliações de exploração dos objetos foram realizadas por observador cego ao tratamento e obtidas manualmente com o auxílio de cronômetros. Foram consideradas explorações quando os animais estavam em contato direto com os objetos por meio do focinho ou das vibrissas. Não foram consideradas explorações quando o animal tocava os objetos com as patas, mas seu foco de visão não era os objetos; ou quando se encontravam bem próximos aos objetos, mas não se voltavam em direção a eles.

4.4. Delineamento experimental

4.4.1: Tratamento agudo:

45 animais de 4 meses de idade foram submetidos a tratamento agudo com cafeína 15mg/kg, cafeína 30mg/kg ou salina. As doses de cafeína ou veículo foram injetadas, intraperitonealmente, 30 minutos antes do início das primeiras sessões de treino das tarefas comportamentais de reconhecimento de novidade espacial e temporal (Barbosa, et al., 2010), bem como das duas condições da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais (Hunsaker & Kesner, 2008). Para cada tarefa ou condição foram usados animais diferentes para que a droga fosse administrada antes das séries de treinos. Assim, um grupo de 15 animais (cafeína 15mg/kg, N=5; cafeína 30mg/kg, N=5; salina, N=5) passou pela tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal e, outros dois grupos de 15 animais (cafeína 15mg/kg, N=5; cafeína 30mg/kg, N=5; salina, N=5) cada passaram pelas condições de alta ou baixa interferência da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais.

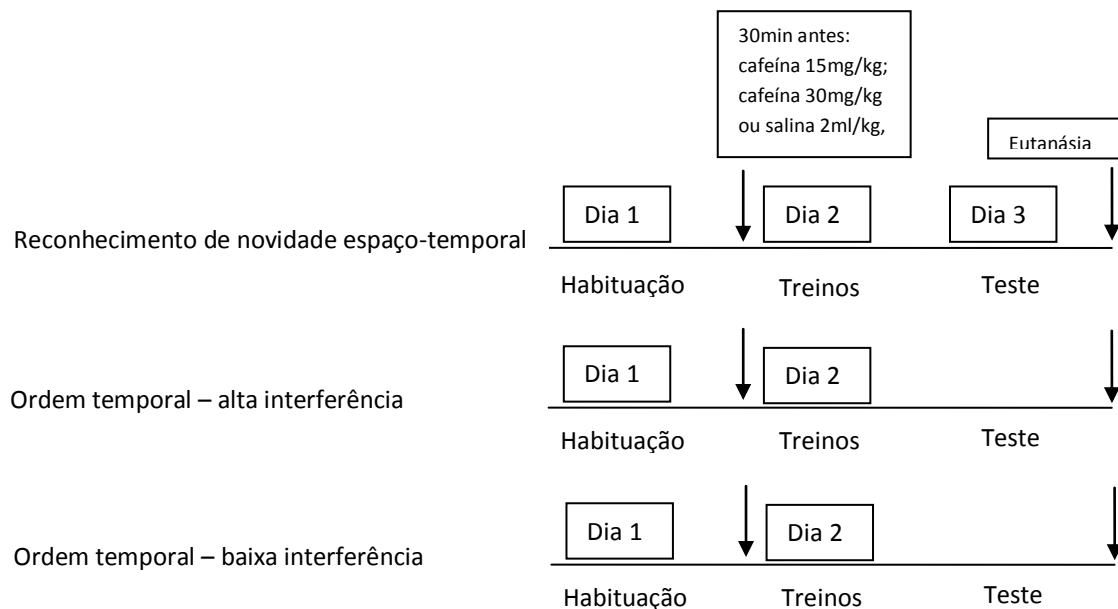


Figura 3: Esquema do delineamento experimental do tratamento agudo.

4.4.2. Tratamento crônico

As doses de cafeína ou veículo foram administradas a 18 animais (cafeína 15mg/kg, N=6; cafeína 30mg/kg, N=6; salina, N=6) por 45 dias, intraperitonealmente. Os animais iniciaram o tratamento crônico com três meses de idade. O BrdU (5-bromo-2-deoxiuridina) foi injetado intraperitonealmente, a partir do segundo dia de administração da cafeína ou salina, por sete dias, com o intuito de marcar todas as novas células geradas na região do giro denteado do hipocampo (neurogênese), para avaliar a sua sobrevivência em virtude do tratamento farmacológico, bem como, a inter-relação desses processos com o aprendizado de tarefas hipocampo-dependentes. As tarefas comportamentais foram executadas a partir de quatro meses de idade dos animais. A partir do 29º dia de administração de cafeína ou salina, foram submetidos à primeira tarefa comportamental. No 29º dia, passaram pela habituação em campo aberto circular; no 30º dia, foram submetidos a dois treinos, intervalados por uma hora, com objetos em disposições diferentes e, no 31º dia, sujeitos a uma sessão de teste, com objetos tanto da primeira quanto da segunda sessões de treino, em posições como nessas sessões, exceto um dos objetos do primeiro treino (objeto deslocado), conforme descrito acima (Barbosa, et al. 2010). A segunda tarefa foi executada a partir do 41º dia de administração dos fármacos, nesse dia foi realizada a habituação dos animais, em campo aberto quadrado; no 42º e 43º dias foram realizadas as sessões de treino, que nessa tarefa são três, cada uma com um objeto em posição distinta e 30 minutos depois, foi efetuado o teste que consiste em rerepresentar os animais aos mesmos objetos, dispostos nas mesmas posições que na primeira e terceira sessões de treino. Todos os animais passaram por condição de alta e baixa interferência, em dias seguidos, correspondendo respectivamente, a disposições dos objetos no teste, mais próximos ou mais afastados, conforme descrito acima (Hunsaker & Kesner, 2008). O intervalo de 12 dias entre as tarefas serviu para analisar o efeito do aprendizado e do tratamento sobre fases diferentes do desenvolvimento dos novos neurônios gerados. Uma vez que, neurônios com 28 dias ainda estavam iniciando sua maturação, enquanto, após 41 dias já estariam mais maduros e integrados à rede neural (ver revisão de Lledo, et al., 2006).

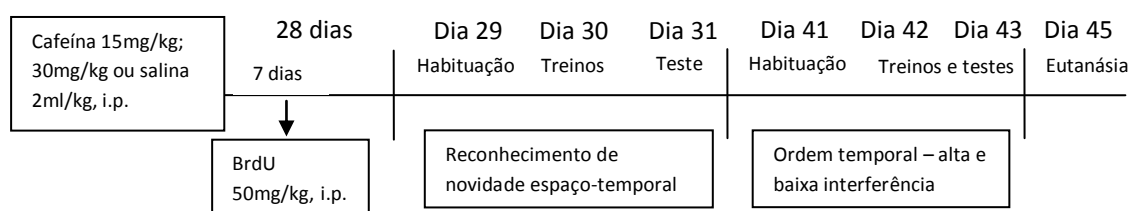


Figura 4: Esquema do delineamento experimental do tratamento crônico.

4.5. Análise imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica só foi realizada com os animais tratados cronicamente, pois consideramos que o tratamento agudo não exerceria influência sobre a sobrevivência neuronal. Após os testes comportamentais, no 45º dia, todos os 18 animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma superdose de tiopental sódico (Cristália, Brasil; 60mg/Kg). Após anestesia, os animais foram perfundidos intracardiamente, por meio de bomba de infusão, com solução salina (NaCl 0,9%, tampão fosfato de sódio, pH 7,4), cerca de 300ml, por 15 minutos, seguida de paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato 0,1 M (TF) pH 7,4, também cerca de 300ml, por 15 minutos, para fixação. Os encéfalos foram removidos, imersos em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato (pH 7,4), a 4°C, para crioproteção. Após esse processo, foram congelados rapidamente em meio de inclusão Tissue-Tek® (Sakura, Japão) dentro de moldes plásticos inseridos em uma mistura de álcool etílico e gelo seco. O material foi mantido em freezer a -80°C.

Cortes coronais da região hipocampal (2,4mm-5,4mm do bregma posterior) com 20 µm de espessura foram obtidos com o uso de criostato (MICROM HM 550) e montados em lâminas histológicas eletricamente carregadas (Super Frost Plus, VWR International, EUA), procedendo-se a seguir com a imunohistoquímica para marcação do BrdU (Sigma-Aldrich) injetado no início do tratamento crônico, bem como de NeuN, uma proteína expressa em núcleos de neurônios maduros. Para revelação do antígeno BrdU foi necessário um pré-tratamento que no caso dos nossos tecidos contou, inicialmente, com a imersão dos cortes em solução de HCl, 2N, por 40 minutos, a 37°C; seguido de incubação por 30 minutos em solução tampão de borato de sódio, 0,1M, pH

8,5, também a 37 °C. As lâminas foram lavadas em solução de PBS, 10mM, pH 7,4, por 10 minutos sob agitação mecânica. A seguir, submetidas a tratamento com tripsina 0,1% em solução de PBS, 10mM, pH 7,4, por dois minutos, a 37°C. As lâminas foram, então, novamente lavadas na solução de PBS sob agitação e incubadas com anticorpos primários (ver abaixo) diluídos em PBS 10mM, 0,5% de Triton X-100 e solução de bloqueio composta por soro normal de cabra (NGS) a 5%, *overnight* a 4°C. Posteriormente, a solução com anticorpos primários foi removida, por meio de lavagem em solução de PBS sob agitação e, os cortes foram incubados com anticorpos secundários diluídos em PBS 10mM e 0,5% de Triton X-100 por duas horas a temperatura ambiente. Por fim, os núcleos celulares foram corados com DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenil-indol) 2mg/ml em PBS 10mM e as secções foram examinadas em microscópio fluorescente (ZEISS Observer.Z1). As fotografias foram feitas em microscopia confocal (Carl ZEISS MicroImaging GmbH BioSciences Division Jena – LSM 710) e de fluorescência (ZEISS Observer.Z1).

Na efetuação dos procedimentos histológicos para analisar a ocorrência ou não dos processos de geração e sobrevivência de novos neurônios, na região do giro denteado hipocampal, em decorrência dos tratamentos, foram utilizados como anticorpos primários: anti-NeuN IgG monoclonal de camundongo (MAB377, Millipore) e anti-BrdU IgG2a monoclonal de rato (ab-6326-250, ABCAM). O primeiro é marcador específico para neurônios maduros e o segundo marca o BrdU injetado nos animais. Foram utilizados anticorpos secundários anti-rato e anti-camundongo conjugados aos fluoróforos Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 546.

Foram obtidas 35 lâminas por animal ou 140 cortes por animal. Os cortes foram coletados sequencialmente a cada cinco lâminas, o que permitiu que em cada lâmina tivéssemos cortes de alturas diferentes. Dessas 35 lâminas, escolhemos uma a cada 10 para análise imunohistoquímica, logo, para cada animal foram realizadas análises de três lâminas, compreendendo uma amostragem de aproximadamente 10% do hipocampo no seu eixo rostro-caudal. As células da porção do giro denteado expressando fluorescência para o anticorpo anti-BrdU e para comarcação com os anticorpos anti-BrdU e NeuN foram contadas manualmente para comparação entre grupos, nas porções dorsais dos giros denteados dos cortes histológicos (hemisférios direito e esquerdo, camadas subgranular e granular, lâminas superior e inferior).

4.6. Análises estatísticas

Para todos os parâmetros comportamentais e avaliação imunohistoquímica foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma ou mais vias proposta por Snedocor (1946) seguida do teste *posthoc* de Bonferroni, ou ainda, análise multivariada (MANOVA), quando a comparação entre grupos envolveu mais de uma variável dependente. Quando a comparação foi feita apenas duas variáveis do mesmo grupo foi utilizado o teste T de Student pareado. Foram feitas correlações bivariadas entre o desempenho mnemônico e o número de células BrdU/NeuN positivas. Todos os testes utilizados foram avaliados ao nível de significância inferior a 5% ($p < / = 0,05$). As análises foram feitas com o auxílio do programa SPSS 18.0.

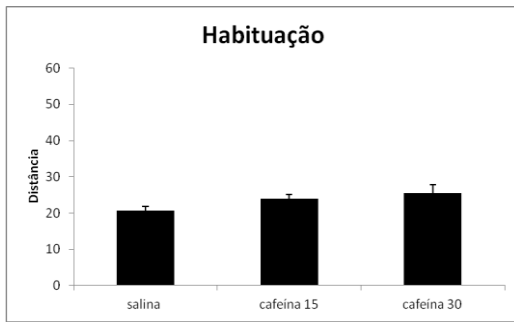
5. Resultados

5.1. Tratamento agudo

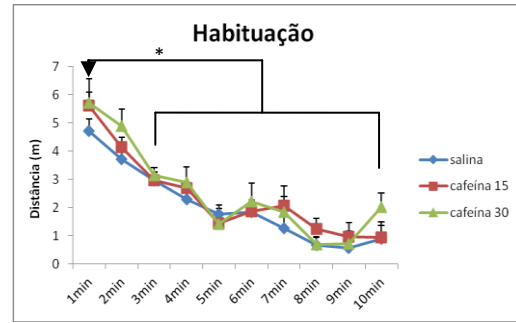
5.1.1. Tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal

I - Habituação: Avaliando a tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal para o tratamento agudo, observou-se que não houve diferença entre grupos durante a habituação, para o parâmetro de distância total percorrida (Gráfico 1.A; ANOVA, $F_{2,12}=2,239$, $p=0,149$), o que era esperado, uma vez que a injeção de drogas só foi dada aos animais no dia seguinte, no dia dos treinos. Considerando a distância percorrida ao longo da sessão de habituação, verificou-se que o primeiro minuto diferiu do terceiro minuto em diante (Gráfico 1.B; ANOVA de medidas repetidas, $F_{9,108}= 31,833$; Teste de Bonferroni, $p<0,05$). A MANOVA não revelou nenhuma relação dos tratamentos com os tempos nas zonas externa e interna (Gráfico 1.C; $F_{2,12}=2,678$, $p=0,109$), conforme esperado. O Teste T para amostras dependentes revelou que o tempo gasto na zona externa foi significativamente superior ao tempo gasto na zona interna, para todos os grupos, na sessão de habituação (Gráfico 1.C; $t_{14}=36,786$, $p<0,001$).

A)



B)



C)

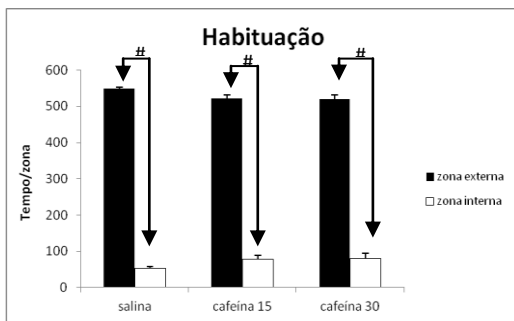
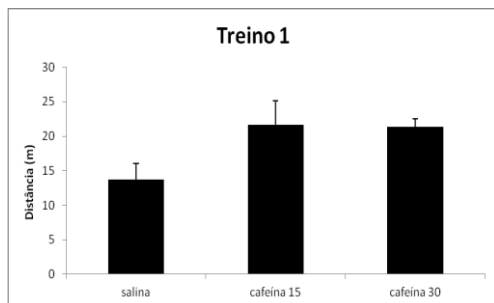


Gráfico 1: Resultados da habituação da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida, ANOVA de uma via, $p > 0,05$. B) ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo; teste de Bonferroni, $\#p < 0,001$. C) MANOVA, $p > 0,05$; Teste T para amostras dependentes para o tempo gasto por zona, $\#p < 0,001$.

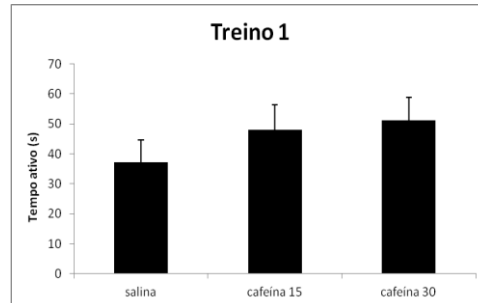
II - Treinos: Houve forte tendência ao efeito da distância entre grupos, no treino 1 (Gráfico 2.A; ANOVA, $F_{2,12}=3,251$, $p=0,074$); o teste de Bonferroni apesar de não significativo, indicou que o grupo salina percorreu menor distância que os grupos cafeína, no treino 1. Considerando ainda esse treino, não foi vista diferença entre grupos para o parâmetro de tempo total de exploração dos objetos (Gráfico 2.B; ANOVA, $F_{2,12}=0,856$, $p=0,449$). A MANOVA não indicou interações entre os grupos quanto à taxa de exploração dos objetos (Gráfico 2.C; objeto 1, $F_{2,12}=0,809$, $p=0,468$; objeto 2, $F_{2,12}=0,720$, $p=0,507$; objeto 3, $F_{2,12}=0,034$, $p=0,967$; objeto 4, $F_{2,12}=0,462$, $p=0,641$). Entretanto, a ANOVA de medidas repetidas indicou efeito da taxa de exploração dos objetos (Gráfico 2.C; $F_{3,36}=6,251$, $p=0,002$), sem efeito do tratamento ($F_{2,12}=0,096$, $p=0,909$) ou interação ($F_{3,36}=0,544$, $p=0,771$). O teste de Bonferroni revelou que a taxa de exploração do objeto 4 era superior a dos objetos 2 ($p=0,016$) e 3 ($p=0,017$); como todos os grupos apresentaram esse padrão sugere-se que ele seja devido à posição do objeto 4 na extremidade e não a um efeito do tratamento. No treino 2, foi verificada

diferença estatisticamente significativa entre grupos quanto à distância percorrida (Gráfico 3.A; ANOVA, $F_{2,12}=7,457$, $p=0,008$), com o teste de Bonferroni sugerindo que o grupo salina percorreu menor distância que os grupos cafeína 15mg/kg ($p=0,021$) e cafeína 30mg/kg ($p=0,015$). Esse dado sugere um efeito hiperlocomotor da cafeína administrada agudamente. Ao mesmo tempo não houve diferença estatística para o parâmetro de tempo total ativo no segundo treino (Gráfico 3.B; $F_{2,12}=0,715$, $p=0,509$). A MANOVA não indicou interações entre os grupos e as taxas de exploração dos objetos no treino 2 (Gráfico 3.C; objeto 1, $F_{2,12}=0,097$, $p=0,909$; objeto 2, $F_{2,12}=0,937$, $p=0,419$; objeto 3, $F_{2,12}=1,107$, $p=0,362$; objeto 4, $F_{2,12}=0,289$, $p=0,754$). A ANOVA de medidas repetidas (Gráfico 3.C) também não indicou efeito do tratamento ($F_{2,12}=1,040$, $p=0,383$), da taxa de exploração dos objetos ($F_{3,36}=0,996$, $p=0,406$), nem da interação entre esses fatores ($F_{3,36}=0,720$, $p=0,636$).

A)



B)



C)

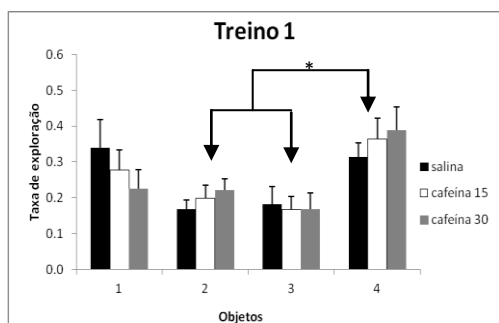
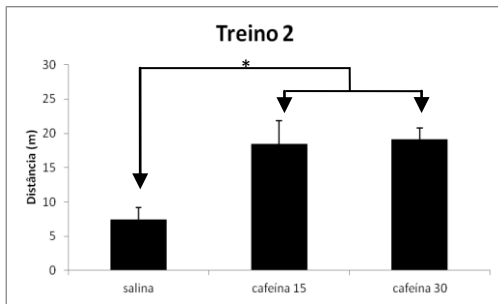
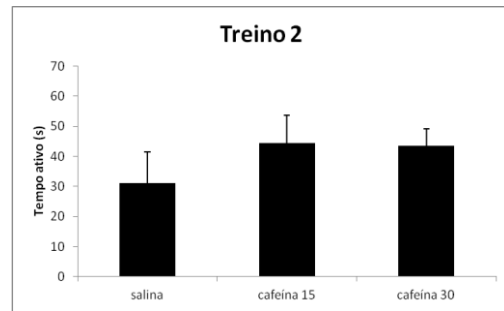


Gráfico 2: Parâmetros de distância total percorrida, tempo ativo total e taxa de exploração dos objetos no treino 1 da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida entre os grupos, ANOVA de uma via $p>0,05$. B) Tempo de exploração total dos objetos entre os grupos, ANOVA de uma via, $p>0,05$. C) Taxa de exploração dos objetos no treino 1, MANOVA, $p>0,05$; ANOVA: efeito da taxa de exploração dos objetos e teste de Bonferroni, $*p<0,05$.

A)



B)



C)

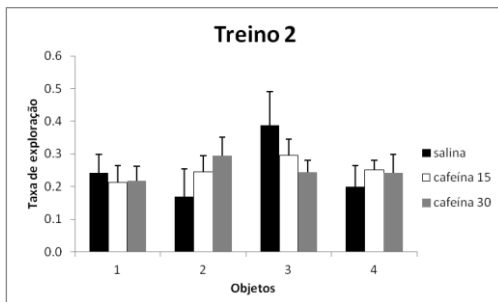
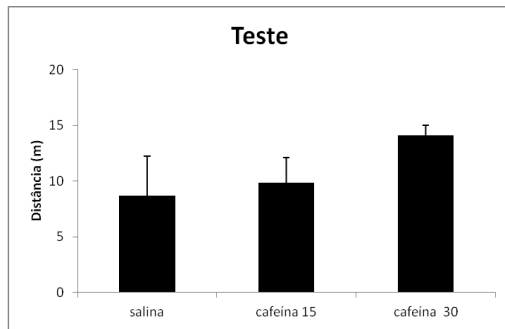


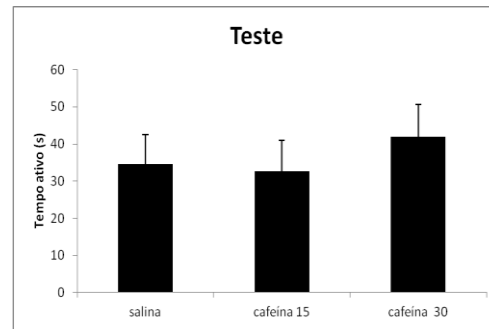
Gráfico 3: Parâmetros de distância total percorrida, tempo total de exploração dos objetos e taxa de exploração dos objetos no treino 2 da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal. Média +/- erro padrão. A) Distância total percorrida, ANOVA de uma via, * $p < 0,05$. B) Tempo de exploração dos objetos, ANOVA de uma via, $p > 0,05$. C) Taxa de exploração dos objetos dentre os grupos, MANOVA e ANOVA, $p > 0,05$.

III – Teste: Não foi encontrada diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto à distância percorrida (Gráfico 4.A; ANOVA, $F_{2,12} = 0,641$, $p = 0,544$), nem quanto ao tempo total ativo (Gráfico 4.B; ANOVA, $F_{2,12} = 0,352$, $p = 0,710$). A MANOVA não revelou interações das taxas de exploração de cada objeto com os tratamentos (Gráfico 4.C; objeto recente 1, $F_{2,12} = 0,641$, $p = 0,544$; objeto recente 2, $F_{2,12} = 1,946$, $p = 0,185$; objeto antigo não-deslocado, $F_{2,12} = 0,891$, $p = 0,436$; objeto antigo deslocado, $F_{2,12} = 0,384$, $p = 0,689$). A ANOVA de medidas repetidas (Gráfico 4.C) para a taxa de exploração dos objetos também não revelou nenhuma diferença significativa, não houve efeito da exploração ($F_{3,36} = 1,337$, $p = 0,278$), do tratamento ($F_{2,12} = 0,667$, $p = 0,531$), ou interação ($F_{6,36} = 0,878$, $p = 0,521$).

A)



B)



C)

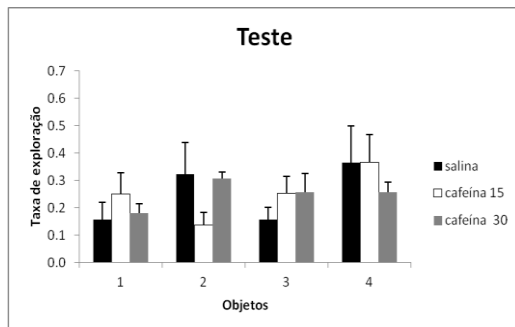


Gráfico 4: Parâmetros de distância total percorrida, tempo ativo total de exploração dos objetos e taxa de exploração dos objetos no teste da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal. Média +/- erro padrão. A) Distância total percorrida, ANOVA de uma via, $p > 0,05$. B) Tempo de exploração dos objetos, ANOVA de uma via e teste de Bonferroni, $p > 0,05$. C) Taxa de exploração dos objetos dentre os grupos, MANOVA e ANOVA de medidas repetidas, $p > 0,05$.

Além disso, a MANOVA não revelou interações significativas entre a taxa de exploração de recentes e antigos (Gráfico 5.A; respectivamente, $F_{2,12}=0,383$, $p=0,690$; $F_{2,12}=0,418$, $p=0,668$); média dos recentes e antigo não-deslocado (Gráfico 5.B; respectivamente, $F_{2,12}=0,397$, $p=0,681$; $F_{2,12}=0,891$, $p=0,436$); antigo deslocado e não-deslocado (Gráfico 5.C; respectivamente, $F_{2,12}=0,891$, $p=0,436$; $F_{2,12}=0,384$, $p=0,689$); e dos recentes entre si (Gráfico 5.D; objeto recente 1, $F_{2,12}=0,641$, $p=0,544$; objeto recente 2, $F_{2,12}=1,946$, $p=0,185$). Testes T intra-grupos incluindo todos os grupos na análise não indicaram diferenças significativas entre os objetos recentes ($t_{14}=-0,938$, $p=0,364$); entre o antigo deslocado e não-deslocado ($t_{14}=1,377$, $p=0,190$); entre a taxa média de exploração dos recentes e o antigo não-deslocado ($t_{14}=0,067$, $p=0,947$); ou entre a taxa de exploração de recentes e antigos ($t_{14}=-1,065$, $p=0,305$). Análises de teste T pareado

realizadas com cada grupo, não indicaram diferenças estatisticamente significativas para o grupo salina (taxa dos objetos recentes entre si, $t_4=-1,076$, $p=0,393$; taxa dos recentes X antigos, $t_4=-0,385$, $p=0,720$; taxa do antigo não-deslocado x antigo deslocado, $t_4=-1,202$, $p=0,296$; taxa média dos recentes X antigo não-deslocado, $t_4=1,813$, $p=0,144$), cafeína 15mg/kg (taxa dos objetos recentes entre si, $t_4=1,551$, $p=0,196$; taxa dos recentes X antigos, $t_4=0,798$, $p=0,470$; taxa do antigo não-deslocado x antigo deslocado, $t_4=0,853$, $p=0,492$; taxa média dos recentes X antigo não-deslocado, $t_4=0,601$, $p=0,580$), ou cafeína 30mg/kg (taxa dos recentes X antigos, $t_4=-0,813$, $p=0,962$; taxa do antigo não-deslocado x antigo deslocado, $t_4=0$, $p=1,000$; taxa média dos recentes X antigo não-deslocado, $t_4=-0,179$, $p=0,867$). Somente para o grupo cafeína 30mg/kg houve tendência à discriminação entre os recentes ($t_4=-2,574$, $p=0,062$).

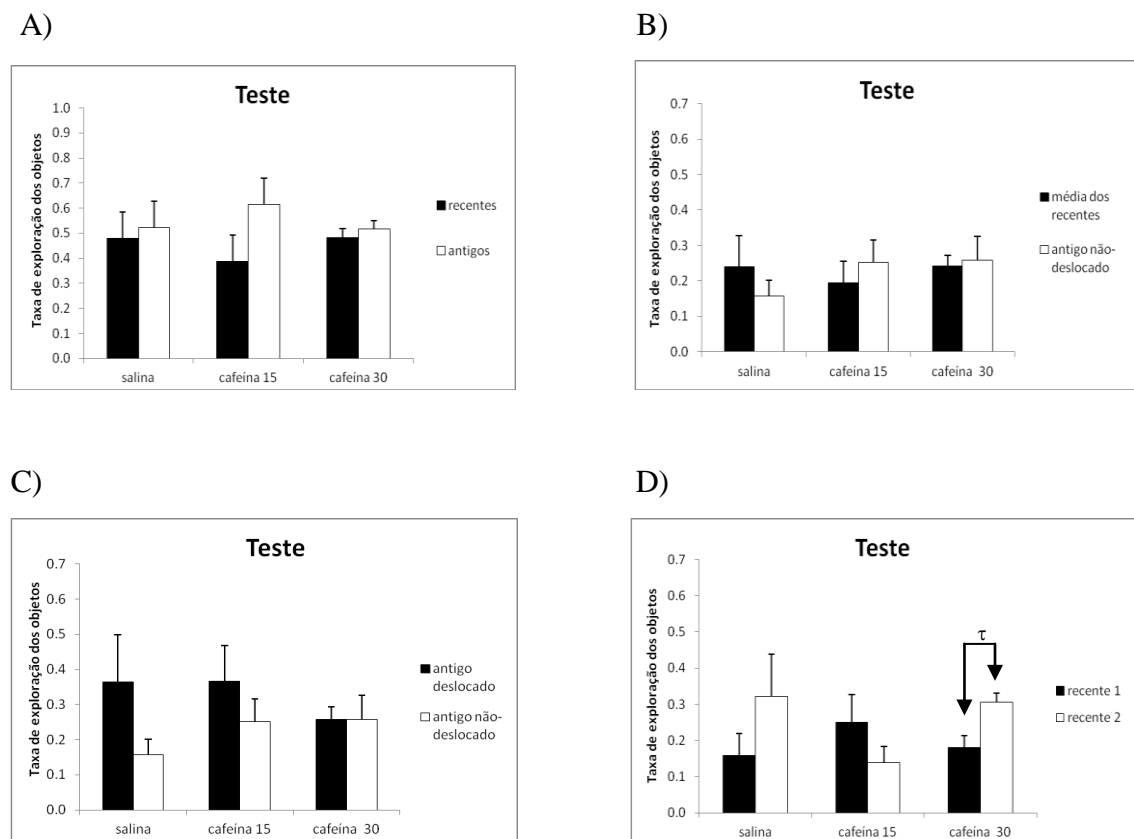


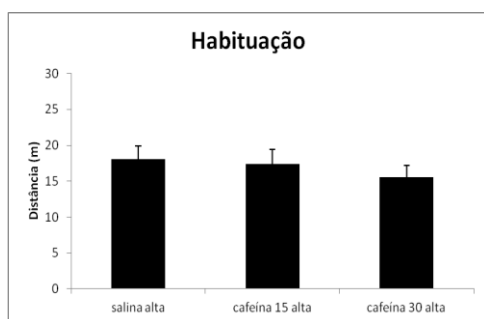
Gráfico 5: Parâmetros de taxa de exploração dos objetos no teste da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal. Média +/- erro padrão. A) Taxa de exploração dos recentes X antigos. B) Taxa média de exploração dos recentes X antigo não-deslocado. C) Taxa de exploração dos objetos antigos não-deslocado e deslocado; teste T pareado, $p>0,05$. D) Taxa de exploração dos objetos recentes; teste T pareado, $^{\tau} p=0,062$. MANOVA e Teste T para amostras relacionadas, $p>0,05$.

5.1.2. Tarefa de ordem temporal para localizações espaciais

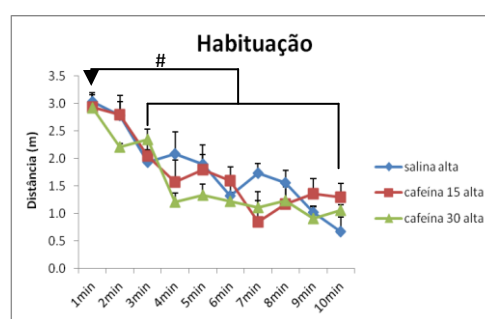
5.1.2.1. Alta interferência

I - Habituação: A avaliação da condição de alta interferência da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais mostrou que os grupos não diferiram quanto à distância total percorrida (Gráfico 6.A; ANOVA, $F_{2,14}=0,507$, $p=0,614$) durante a habituação, haja vista que o tratamento agudo só foi efetuado no dia seguinte, quando são realizados os treinos e o teste. Considerando a distância percorrida por minuto na sessão de habituação, foi visto que o primeiro minuto difere do terceiro em diante (Gráfico 6.B; ANOVA de medidas repetidas, $F_{9,108}=34,584$ e teste de Bonferroni, $p<0,001$). Foi mostrada também uma interação significativa entre o tempo e o tratamento (ANOVA de medidas repetidas, $F_{18,108}=2,154$ e teste de Bonferroni, $p=0,008$), mas sem efeito do tratamento (ANOVA de medidas repetidas, $F_{2,14}=0,507$, $p=0,614$), conforme esperado. Todos os grupos apresentaram preferência pela zona externa em comparação à interna (Gráfico 6.C, Teste T pareado, $t_{14}=43,275$, $p<0,001$); não foi mostrada interação entre os tempos gastos por zona e os tratamentos (MANOVA, $F_{2,14}=1,331$, $p=0,301$).

A)



B)



C)

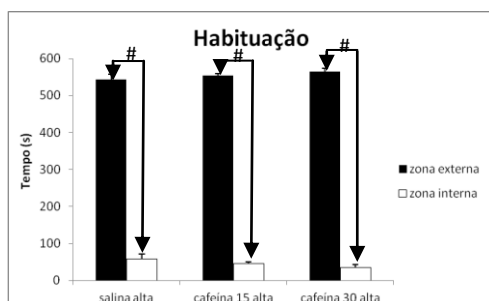
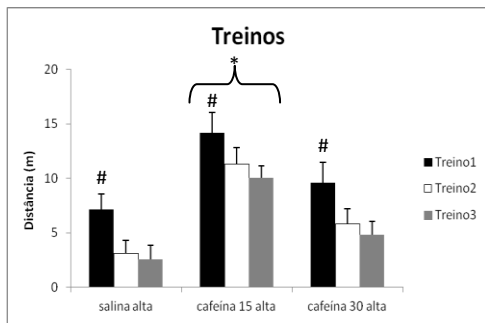


Gráfico 6: Habituação na condição de alta interferência da tarefa de ordem temporal de localizações espaciais, alta interferência. Média +/- erro padrão. A) Distância total percorrida, ANOVA de uma via, $p>0,05$. B) ANOVA de medidas repetidas, efeito da

distância ao longo do tempo e teste de Bonferroni, # $p < 0,001$. C) MANOVA, $p > 0,05$. Teste T para amostras dependentes, # $p < 0,001$, para o parâmetro de tempo gasto por zona.

II – Treinos: foi visto que houve diferenças significativas para a distância percorrida entre os treinos (Gráfico 7.A; MANOVA, treino 1, $F_{2,12}=4,137$, $p=0,043$; treino 2, $F_{2,12}=8,932$, $p=0,004$; treino 3, $F_{2,12}=9,995$, $p=0,003$). O teste de Bonferroni indicou que no treino 1, a diferença era devido à maior exploração do ambiente pelo grupo cafeína 15mg/kg em comparação ao salina ($p=0,045$); no treino 2, o grupo cafeína 15mg/kg percorreu maior distância que o cafeína 30mg/kg ($p=0,050$) e que o salina ($p=0,004$); o mesmo ocorreu no treino 3 (respectivamente, $p=0,030$ e $p=0,003$). A ANOVA de medidas repetidas (Gráfico 7.A) corroborou o resultado da MANOVA, havendo efeito da distância percorrida ($F_{2,24}=31,653$, $p < 0,001$), do tratamento ($F_{2,12}=8,243$, $p=0,006$), mas sem interação entre esses fatores ($F_{4,24}=0,189$, $p=0,942$). O teste de Bonferroni sugeriu que o grupo cafeína 15mg/kg apresentou maior exploração que o cafeína 30mg/kg ($p=0,059$) e que o salina ($p=0,005$); ao mesmo tempo, a distância percorrida durante o treino 1 foi significativamente superior àquela do treino 2 ($p=0,001$) e treino 3 ($p < 0,001$). Esses resultados sugerem efeito hiperlocomotor da administração aguda de cafeína 15mg/kg, o que não foi evidenciado no grupo cafeína 30mg/kg, sugerindo que uma possível elevação da ansiedade provocada por essa dose pode ter causado efeito hipolocomotor. Quanto à interação entre os tempos ativos nas sessões de treinos e os grupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (MANOVA, treino 1, $F_{2,12}=2,591$, $p=0,116$; treino 2, $F_{2,12}=1,869$, $p=0,197$; treino 3, $F_{2,12}=2,234$, $p=0,150$). Entretanto a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tempo ativo ($F_{2,24}=4,973$, $p=0,016$), mas não do tratamento ($F_{2,12}=2,632$, $p=0,113$) ou interação ($F_{4,24}=0,443$, $p=0,776$), corroborando, nesse caso, o resultado da MANOVA. O teste de Bonferroni indicou que o treino 1 apresentou maior tempo de exploração que o treino 3, $p=0,031$.

A)



B)

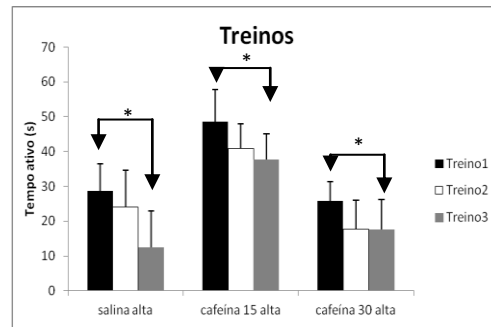
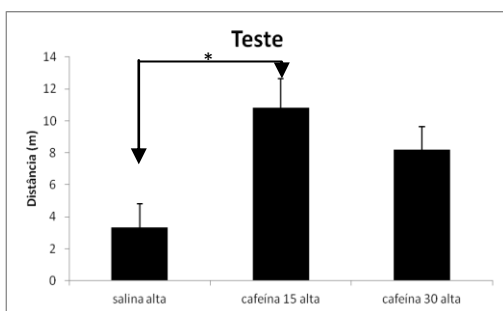


Gráfico 7: Treinos da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, alta interferência. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida em cada treino, MANOVA e ANOVA de medidas repetidas. Teste de Bonferroni, *p<0,05; #p= ou <0,001. B) Tempo ativo em cada treino, MANOVA e ANOVA de medidas repetidas. Teste de Bonferroni, *p<0,05.

III – Teste: Foi vista diferença estatisticamente significativa entre os grupos para o parâmetros de distância percorrida (Gráfico 8.A; ANOVA, $F_{2,12}=5,770$, $p=0,018$). O teste de Bonferroni indicou que o grupo cafeína 15mg/kg apresentou maior distância percorrida que o grupo salina, $p=0,017$. Já para o tempo ativo, houve uma forte tendência à diferença entre os grupos (Gráfico 8.B; ANOVA, $F_{2,12}=3,656$, $p=0,058$). O teste de Bonferroni, apesar de não significativo, sugeriu que os grupos cafeína 15 e 30mg/kg apresentaram maior tempo ativo que o salina, $p=0,105$ e $p=0,120$, respectivamente.

A)



B)

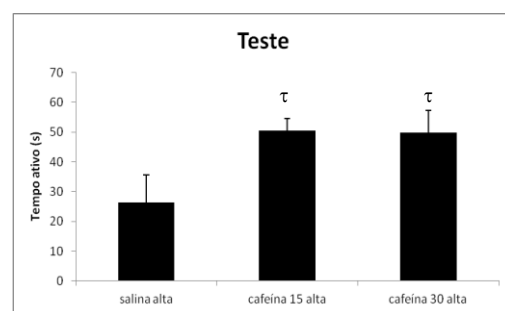
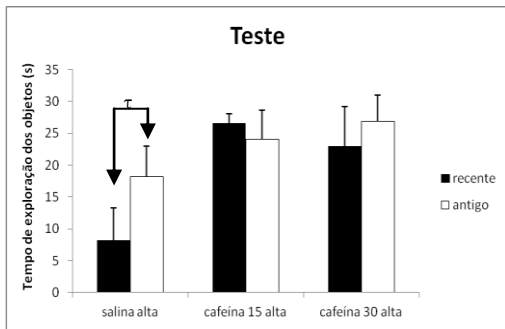


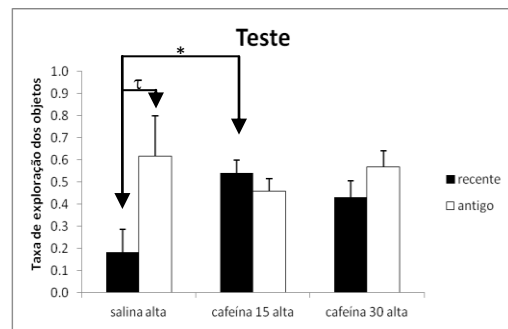
Gráfico 8: Teste da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, alta interferência. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida, ANOVA e teste de Bonferroni, *p<0,05. B) Tempo ativo, ANOVA de uma via e Teste de Bonferroni, $p=0,105$ e $p=0,120$.

Quanto ao tempo de exploração do objeto antigo em comparação ao recente entre grupos não foi vista nenhuma relação estatisticamente significativa (Gráfico 9.A; MANOVA, objeto antigo, $F_{2,14}=1,104$, $p=0,359$; objeto recente, $F_{2,14}=1,090$, $p=0,363$), porém análises intra-grupos para cada tratamento revelaram que o grupo salina apresentou tendência a maior exploração do objeto antigo (Gráfico 9.A; teste T pareado, $t_4=2,461$, $p=0,070$), o que não foi evidenciado nos demais grupos (teste T pareado, cafeína 15mg/kg, $t_4=-0,458$, $p=0,671$; cafeína 30mg/kg, $t_4=0,542$, $p=0,617$). A MANOVA (Gráfico 9.B) indicou diferenças estatisticamente significativas somente para interação do parâmetro de taxa de exploração do objeto recente com o tratamento ($F_{2,12}=5,170$, $p=0,024$), mas não da taxa do objeto antigo ($F_{2,12}=0,487$, $p=0,626$). O teste de Bonferroni indicou que o grupo cafeína 15mg/kg apresentou maior taxa de exploração do objeto recente que o salina ($p=0,026$), mas não maior taxa do objeto antigo. Esse resultado sugere que o grupo cafeína 15mg/kg administrado agudamente teve um desempenho inferior ao grupo que recebeu apenas uma injeção de salina. Ao mesmo tempo os resultados de maior exploração do meio (Gráfico 8.A) e dos objetos (Gráfico 8.B) sugerem que o grupo cafeína 15mg/kg apresentou hiperlocomoção e a falta de discriminação dos objetos pode ser decorrente desse fato. Teste T pareado avaliando a taxa de exploração do objeto antigo e do recente, incluindo todos os grupos, não indicou diferenças estatísticas significativas ($t_{14}=1,558$, $p=0,142$). Entretanto, análises de testes T pareados para cada grupo evidenciaram que o grupo salina apresentou tendência a maior taxa de exploração do objeto antigo que do recente, o que não é reproduzível nos demais grupos (Gráfico 9.B, teste T pareado, salina, $t_4=2,005$, $p=0,115$; cafeína 15mg/kg, $t_4=-0,713$, $p=0,515$; cafeína 30mg/kg, $t_4=0,936$, $p=0,902$). Como o teste T não foi capaz de revelar uma tendência muito expressiva, é possível ser devido ao pequeno número amostral dos grupos ($N=5$). Esse resultado corrobora a sugestão acima para o tempo de exploração, houve visivelmente preferência do grupo salina pelo objeto antigo. A ANOVA não revelou diferença entre grupos para a taxa de discriminação entre os objetos (Gráfico 9.C; $F_{2,12}=2,587$, $p=0,116$).

A)



B)



C)

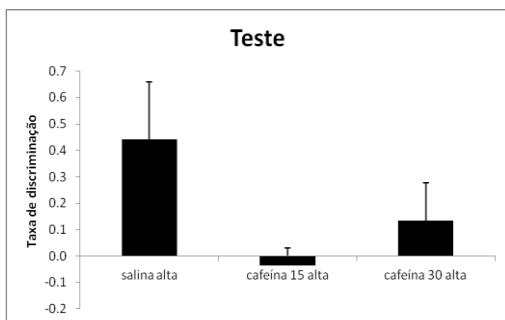
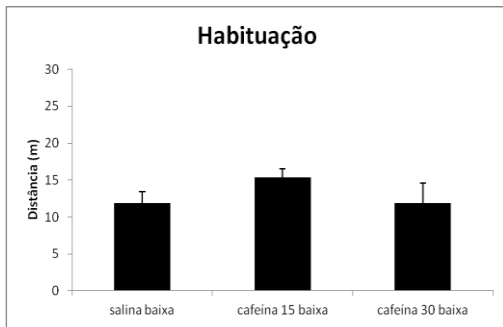


Gráfico 9: Teste da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, alta interferência. Média +/- erro padrão. A) Tempo de exploração dos objetos, MANOVA e teste de Bonferroni, $p > 0,05$; teste T pareado, $\tau p = 0,070$. B) Taxa de exploração dos objetos, MANOVA e teste de Bonferroni, $*p < 0,05$; Teste T pareado, $\tau p = 0,115$. C) Taxa de discriminação entre os objetos por grupo, ANOVA, $p > 0,05$.

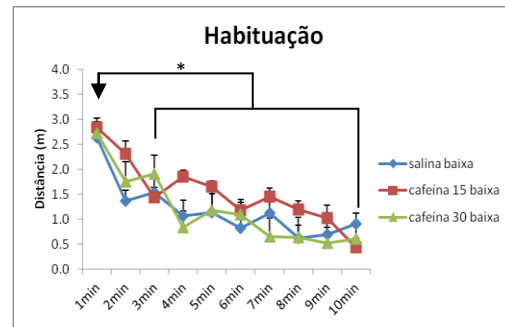
5.1.2.2. Baixa interferência

I – Habituação: Não foi vista nenhuma diferença estatisticamente significativa, entre grupos, para a distância total percorrida durante a habituação (Gráfico 10.A, ANOVA, $F_{2,12} = 1,094$, $p = 0,366$). A ANOVA de medidas repetidas indicou efeito do tempo na distância percorrida (Gráfico 10.B; $F_{9,108} = 24,300$, $p < 0,001$) e, uma tendência à interação tempo e tratamento ($F_{18,108} = 1,600$, $p = 0,073$), mas sem efeito do tratamento ($F_{2,12} = 1,095$, $p = 0,366$), o que era esperado, já que o tratamento só foi efetuado no dia seguinte. O teste de Bonferroni revelou que o primeiro minuto diferiu do terceiro minuto em diante, $p < 0,05$ (Gráfico 10.B). A MANOVA não revelou efeitos de interação do tempo gasto por zona com o tratamento ($F_{2,12} = 0,125$, $p = 0,884$). O Teste T pareado indicou diferença estatisticamente significativa intra grupos para o tempo de exploração por zonas, na habituação ($t_{14} = 69,293$, $p < 0,001$; Gráfico 10.C).

A)



B)



C)

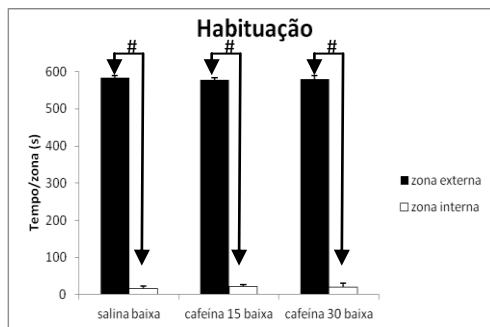
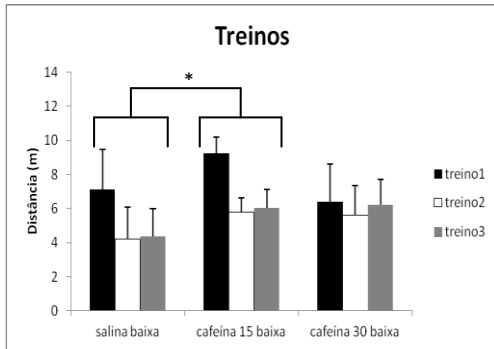


Gráfico 10: Habituação da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, baixa interferência. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida, ANOVA, $p > 0,05$. B) Distância por minuto, ANOVA de medidas repetidas e teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. C) Tempo gasto por zona, Teste T pareado, $\#p < 0,001$.

II – Treinos: Não foram vistas diferenças significativas para interações entre a distância percorrida nos treinos pelos grupos (Gráfico 11.A; MANOVA, treino 1, $F_{2,12}=0,592$, $p=0,569$; treino 2, $F_{2,12}=0,315$, $p=0,736$; treino 3, $F_{2,12}=0,506$, $p=0,615$). A ANOVA de medidas repetidas (Gráfico 11.A) revelou que houve efeito da distância percorrida ($F_{2,24}=5,365$, $p=0,012$), mas sem interação da distância com o tratamento ($F_{4,24}=0,834$, $p=0,517$), nem efeito do tratamento ($F_{2,12}=0,386$, $p=0,688$). O teste de Bonferroni sugeriu que o grupo cafeína 15mg/kg apresentou maior exploração que o salina ($p=0,010$), embora não houvesse efeito do tratamento na ANOVA. Esse resultado, assim como visto para a condição de alta interferência, sugeriu efeito hiperlocomotor da administração aguda de cafeína 15mg/kg. Quanto à interação entre os tempos ativos nas sessões de treinos e os grupos, não foram vistas diferenças estatisticamente significativas (Gráfico 11.B; MANOVA, treino 1, $F_{2,12}=0,371$, $p=0,697$; treino 2, $F_{2,12}=0,365$, $p=0,702$; treino 3, $F_{2,12}=0,421$, $p=0,666$). ANOVA de medidas repetidas corroborou os achados da MANOVA não indicando efeito significativo do tempo ativo

($F_{2,24}=0,374$, $p=0,692$), nem do tratamento ($F_{2,12}=0,116$, $p=0,891$) ou interação ($F_{4,24}=0,624$, $p=0,616$).

A)



B)

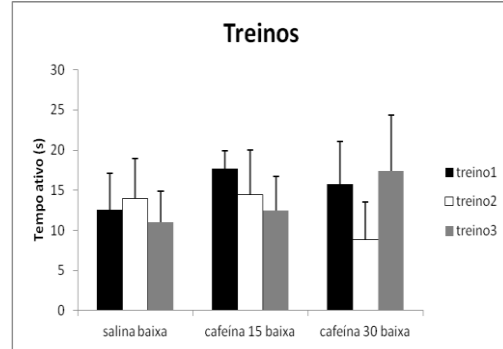
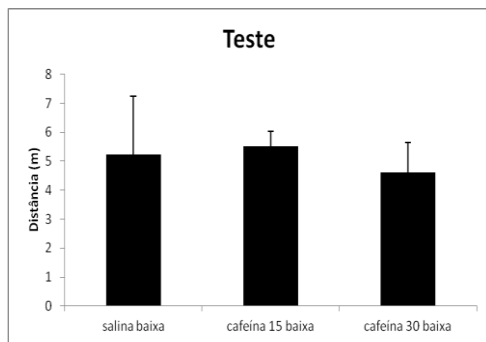


Gráfico 11: Treinos da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, baixa interferência. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida em cada treino, MANOVA, $p>0,05$; ANOVA de medidas repetidas e teste de Bonferroni, $*p<0,05$. B) Tempo ativo em cada treino, MANOVA e ANOVA de medidas repetidas, $p>0,05$.

III – Teste: não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os parâmetros de distância percorrida (Gráfico 12.A; ANOVA, $F_{2,12}=0,112$, $p=0,895$) e tempo ativo (Gráfico 12.B; ANOVA, $F_{2,12}=0,751$, $p=0,493$).

A)



B)

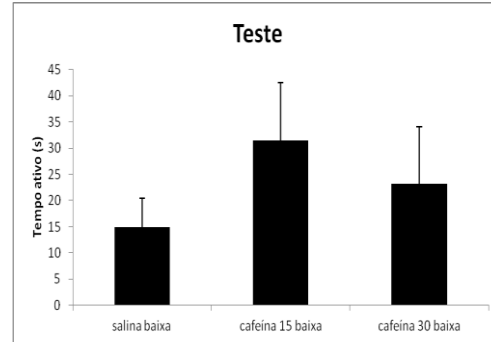
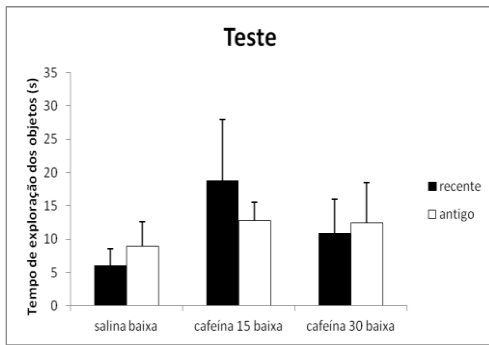


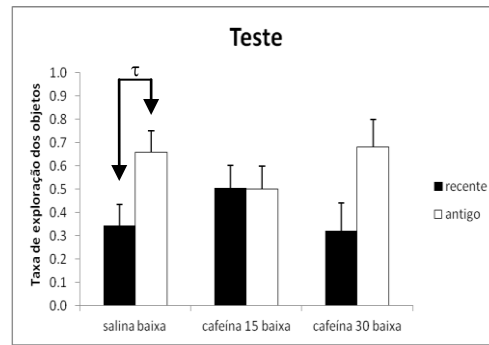
Gráfico 12: Teste da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, baixa interferência. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida, ANOVA $p>0,05$. B) Tempo ativo, ANOVA, $p>0,05$.

Quanto ao tempo de exploração do objeto antigo em comparação ao recente entre grupos não foi vista nenhuma relação estatisticamente significativa (Gráfico 13.A; MANOVA, objeto antigo, $F_{2,12}=0,231$, $p=0,797$; objeto recente, $F_{2,14}=1,074$, $p=0,372$); análises intra grupos também não indicaram diferenças estatisticamente significativas nos tempos de exploração dos objetos (Gráfico 13.A; teste T pareado, $t_{14}=-0,194$, $p=0,849$). Análises de teste T pareado para cada grupo corroboram o resultado acima para o parâmetro de tempo de exploração dos objetos (teste T pareado, salina, $t_4=0,977$, $p=0,384$; cafeína 15mg/kg, $t_4=-0,782$, $p=0,478$; cafeína 30mg/kg, $t_4=0,842$, $p=0,447$). A MANOVA (Gráfico 13.B) não indicou diferenças estatisticamente significativas para interação do parâmetro taxa de exploração do objeto recente com o tratamento ($F_{2,12}=0,925$, $p=0,423$), nem da taxa do objeto antigo ($F_{2,12}=0,983$, $p=0,425$). O Teste T pareado avaliando a taxa de exploração do objeto antigo e recente revelou uma tendência à diferença intra grupos ($t_{14}=2,888$, $p=0,080$), sugerindo que o objeto antigo foi mais explorado que o recente. Isso pôde ser evidenciado nas análises de teste T pareado para cada grupo, revelando tendência à discriminação no grupo salina e, em menor expressão, no grupo cafeína 30mg/kg (Gráfico 13.B, salina, $t_4=1,754$, $p=0,154$; cafeína 15mg/kg, $t_4=-0,020$, $p=0,985$; cafeína 30mg/kg, $t_4=1,513$, $p=0,205$). A ANOVA não revelou diferença entre grupos para a taxa de discriminação entre os objetos (Gráfico 13.C; $F_{2,12}=0,934$, $p=0,420$).

A)



B)



C)

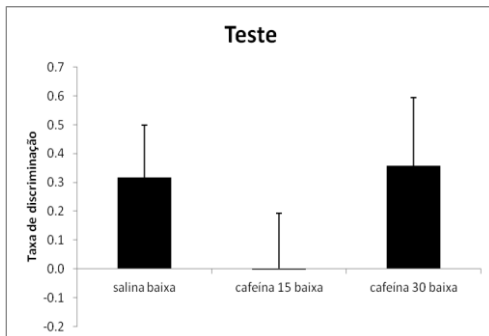


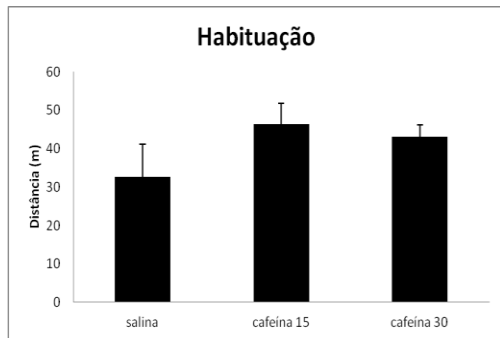
Gráfico 13: Teste na condição de baixa interferência. Média +/- erro padrão. A) Tempo de exploração dos objetos, MANOVA e Teste T, $p > 0,05$. B) Taxa de exploração dos objetos, MANOVA, $p > 0,05$ e Teste T, salina, $\tau = 0,154$. C) Taxa de discriminação, ANOVA, $p > 0,05$.

5.2. Tratamento crônico

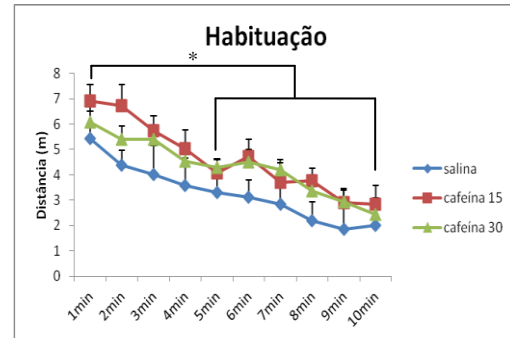
5.2.1. Tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal

I – Habituação: Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos considerando a distância total percorrida, em metros, segundo a ANOVA de uma via ($F_{2,15} = 1,404$, $p = 0,276$; Gráfico 14.A). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito do tempo ao longo da sessão ($F_{2,15} = 27,767$, $p < 0,001$), e o teste de Bonferroni indicou que do quinto minuto em diante houve redução da distância percorrida em relação ao primeiro minuto ($p < 0,05$; Gráfico 14.B). Comparando-se os tempos gastos nas zonas interna e externa, não houve efeito do tratamento nos tempos de exploração por zona (MANOVA, $F_{2,15} = 1,240$, $p = 0,319$; $F_{2,15} = 1,239$, $p = 0,319$), entretanto, houve, para todos os grupos, maior tempo de exploração da zona externa que na interna, de acordo com Teste T para amostras dependentes ($t_5 = 15,793$, $p < 0,001$; Gráfico 14.C).

A)



B)



C)

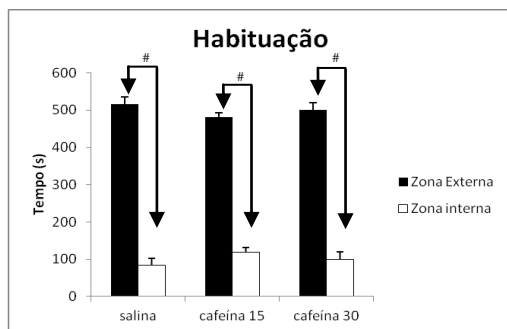
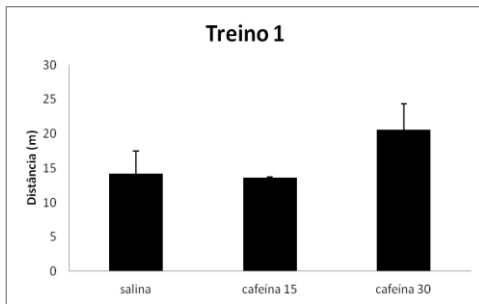


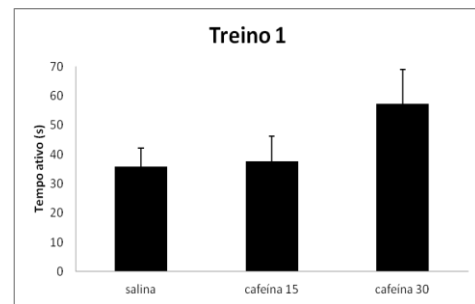
Gráfico 14: Resultados da habituação da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal. Média +/- erro padrão. A) Distância total, ANOVA de uma via, $p > 0,05$. B) Distância por minuto, ANOVA de medidas repetidas, efeito do tempo e teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. C) Tempo gasto por zona, Teste T para amostras dependentes, $\#p < 0,001$.

II – Treinos: Quanto às sessões de treino, não houve diferença entre os grupos para os parâmetros de distância total percorrida e tempo total de exploração dos objetos, tanto para o treino 1 ($F_{2,15} = 1,563$, $p = 0,242$; $F_{2,15} = 1,681$, $p = 0,219$; Gráficos 15.A e B), quanto para o treino 2 ($F_{2,15} = 0,175$, $p = 0,841$; $F_{2,15} = 0,296$, $p = 0,748$; Gráficos 16.A e B). Já para a taxa de exploração entre os objetos, a MANOVA não evidenciou efeito do tratamento, taxa de exploração do objeto, nem interação entre esses fatores; mas houve novamente efeito da taxa de exploração do objeto como uma preferência do objeto 4, em relação aos objetos 2 e 3, no treino 1 (ANOVA de medidas repetidas, $F_{1,4; 22,4} = 6,090$, $p = 0,013$; Teste de Bonferroni, $p < 0,05$; Gráfico 15.C), enquanto não houve nenhuma preferência entre os objetos no treino 2 (ANOVA de medidas repetidas, $F_{3,45} = 1,651$, $p = 0,191$; Gráfico 16.C) dentre os grupos.

A)



B)



C)

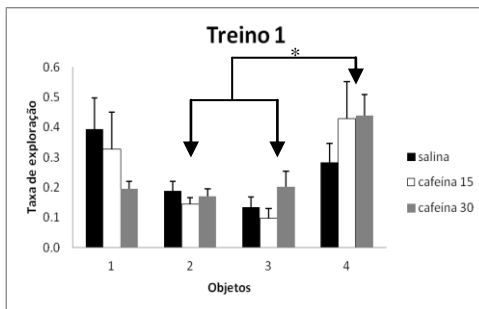
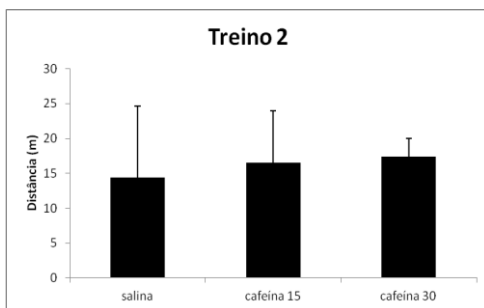
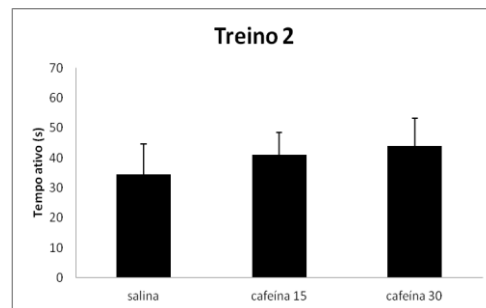


Gráfico 15: Parâmetros de distância total percorrida, tempo ativo total e taxa de exploração dos objetos no treino 1 da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida entre os grupos, ANOVA de uma via, $p > 0,05$. B) Tempo de exploração total dos objetos entre os grupos, ANOVA de uma via, $p > 0,05$. C) Taxa de exploração dos objetos dentre grupos, MANOVA, $p > 0,05$; ANOVA de medidas repetidas: efeito da taxa de exploração dos objetos e teste de Bonferroni, $*p < 0,05$.

A)



B)



C)

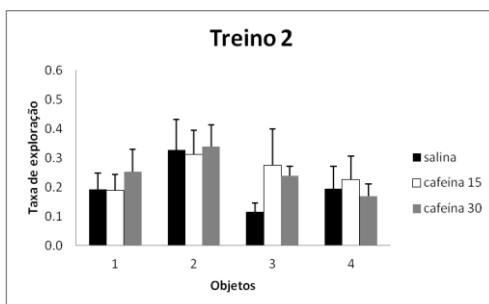
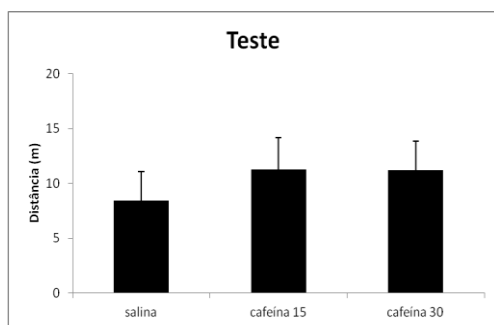


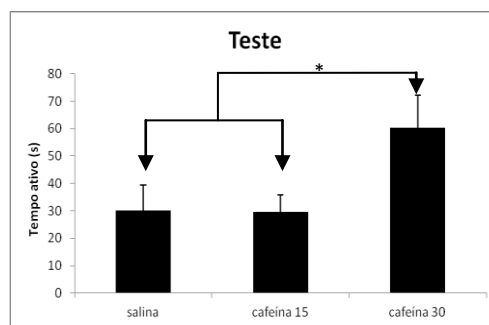
Gráfico 16: Parâmetros de distância total percorrida, tempo total de exploração dos objetos e taxa de exploração dos objetos no treino 2 da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal. Média +/- erro padrão. A) Distância total percorrida, ANOVA de uma via, $p > 0,05$. B) Tempo de exploração dos objetos, ANOVA de uma via, $p > 0,05$. C) Taxa de exploração dos objetos dentre os grupos, MANOVA e ANOVA de medidas repetidas, $p > 0,05$.

III – Teste: Foram avaliadas a distância, o tempo ativo total e as taxas de exploração de cada objeto (Gráfico 17). A ANOVA não revelou efeito da distância entre os grupos ($F_{2,15} = 0,354$, $p = 0,708$; Gráfico 17.A). A ANOVA mostrou que o tempo ativo diferiu entre os grupos ($F_{2,15} = 3,768$, $p = 0,047$) e o teste de Bonferroni indicou tal diferença era mostrada como tendência entre o grupo cafeína 30mg/kg e os demais, $p = 0,09$ (Gráfico 17.B). Quanto às taxas de exploração de cada objeto no teste, a MANOVA indicou tendência ao efeito do tratamento na taxa de exploração do objeto antigo não-deslocado ($F_{2,15} = 3,133$, $p = 0,073$), com teste de Bonferroni indicando tendência do grupo cafeína 15mg/kg apresentar maior taxa de exploração que os demais, $p = 0,081$ (Gráfico 17.C). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito da taxa de exploração de cada objeto ($F_{3,45} = 4,495$, $p = 0,008$), sem efeito do tratamento ou interação e o teste de Bonferroni indicou forte tendência à taxa do objeto antigo deslocado ser superior a um dos recentes (recente 2), $p = 0,052$ (Gráfico 17.C).

A)



B)



C)

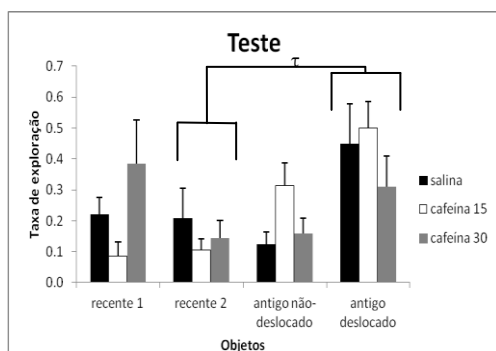
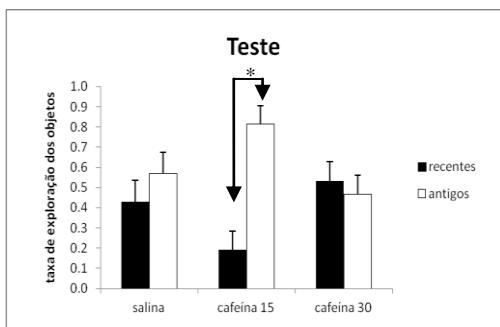


Gráfico 17: Parâmetros de distância total percorrida, tempo ativo total de exploração dos objetos e taxa de exploração dos objetos no teste da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal. Média +/- erro padrão. A) Distância total percorrida, ANOVA de uma via, $p > 0,05$. B) Tempo de exploração dos objetos, ANOVA de uma via e teste de Bonferroni, $*p < 0,05$. C) Taxa de exploração dos objetos dentre os grupos, ANOVA de medidas repetidas, efeito da taxa de exploração, $p < 0,05$ e teste de Bonferroni, $†p = 0,052$; MANOVA e teste de Bonferroni, $p > 0,05$.

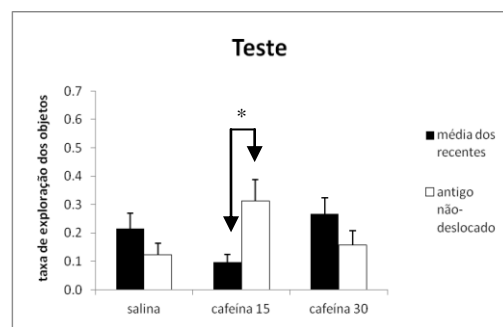
Foram avaliadas ainda comparações entre as taxas de exploração dos objetos: recentes X antigos, média da taxa dos recentes X antigo não-deslocado, antigo deslocado X não-deslocado e recentes entre si (Gráfico 18). As análises de variância multivariada (MANOVA) indicaram tendências ao efeito do tratamento na taxa de exploração de recentes X antigos (respectivamente, $F_{2,15} = 2,906$, $p=0,086$; $F_{2,15} = 3,041$, $p=0,078$). O teste de Bonferroni sugeriu tendência do grupo salina apresentar maior taxa de exploração dos recentes que o grupo cafeína 15mg/kg, $p=0,091$ e, em contrapartida, o grupo cafeína 15mg/kg apresentar maior taxa de exploração dos antigos em comparação ao salina, $p=0,081$ (Gráfico 18.A). A MANOVA indicou também tendência ao efeito do tratamento quanto a avaliações da taxa de exploração do antigo não-deslocado X a taxa média de exploração dos recentes (respectivamente, $F_{2,15} = 3,133$, $p=0,073$; $F_{2,15} = 3,488$, $p=0,057$); com o teste de Bonferroni indicando que o cafeína 30mg/kg tendeu a apresentar maior taxa média de exploração dos recentes que o cafeína 15mg/kg, $p=0,063$ e, cafeína 15mg/kg tendeu a apresentar taxa de exploração de objeto antigo não-deslocado que a média dos recentes, $p=0,098$ (Gráfico 18.B). A MANOVA não indicou efeito do tratamento nas comparações entre as taxas de exploração de antigo deslocado entre grupos ($F_{2,15} = 0,857$, $p=0,444$), mas indicou uma tendência quanto às taxas do antigo não-deslocado ($F_{2,15} = 3,133$, $p=0,073$), conforme visto acima (Gráfico 18.C). Não houve efeito quanto à comparação das taxas de exploração dos objetos recentes entre si (MANOVA, $F_{2,15} = 2,641$, $p=0,104$; $F_{2,15} = 0,599$, $p=0,562$; Gráfico 5.D). Os Testes T pareados não revelaram diferenças intra grupo nem para o controle, nem para o grupo cafeína 30mg/kg quanto à avaliação das taxas de exploração de recentes X antigos (Gráfico 18.A, respectivamente, $t_5 = 0,644$, $p=0,548$; $t_5 = -1,426$, $p=0,216$) e média dos recentes X antigo não-deslocado (Gráfico 18.B, respectivamente, $t_5 = 1,742$, $p=0,144$; $t_5 = 1,234$, $p=0,272$); já os animais cafeína 15mg/kg exploraram significativamente mais os objetos antigos em comparação aos recentes ($t_5 = -2,908$, $p=0,033$; Gráfico 18.A), bem como o objeto antigo não-deslocado em relação à taxa média de exploração dos objetos recentes ($t_5 = 2,645$, $p=0,046$; Gráfico 18.B). Esses resultados para o grupo cafeína 15mg/kg indicaram que o grupo apresentou discriminação temporal, mas não espacial dos objetos. Uma análise realizada para cada grupo, revelou no grupo salina, uma tendência ao efeito da taxa de exploração do antigo deslocado ser superior a do não-deslocado, sugerindo uma tendência à discriminação espacial (Teste T pareado, $t_5 = -2,043$, $p=0,097$; Gráfico 18.C). O que não foi visto nos

grupos tratados (Teste T pareado, cafeína 15mg/kg, $t_s=-1,230$, $p=0,273$; cafeína 30mg/kg, $t_s=-1,345$, $p=0,237$; Gráfico 18.C). Também não houve diferença entre as taxas de exploração dos dois objetos recentes, dentre os grupos (Teste T pareado, salina, $t_s=0,087$, $p=0,934$; cafeína 15mg/kg, $t_s=-0,303$, $p=0,774$; cafeína 30mg/kg, $t_s=1,294$, $p=0,252$; Gráfico 18.D), conforme esperado. As análises estatísticas que revelaram apenas tendência a efeitos e não diferença significativa poderiam se dever ao pequeno número amostral por grupo (N=6) com grande variância.

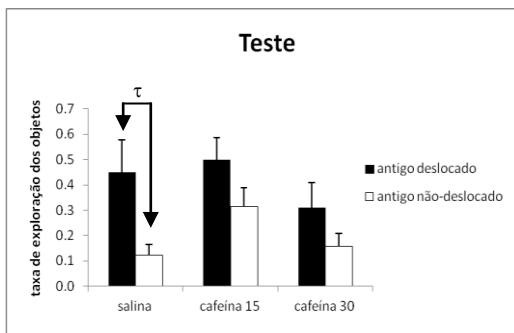
A)



B)



C)



D)

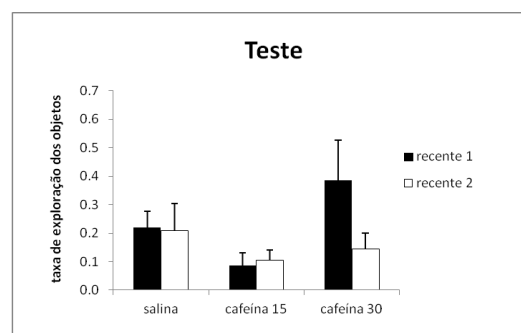
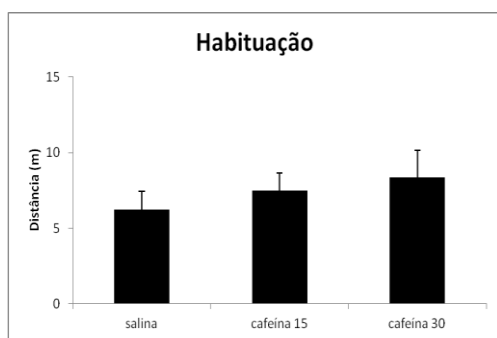


Gráfico 18: Parâmetros de taxa de exploração dos objetos recentes X antigos; média dos recentes X antigo não-deslocado; antigos não-deslocado e deslocado e de cada objeto recente, no teste da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal. Média +/- erro padrão. A) Taxa de exploração dos recentes X antigos, MANOVA, $p>0,05$; teste T para amostras relacionadas, $*p<0,05$. B) Taxa média de exploração dos recentes X antigo não-deslocado, MANOVA, $p>0,05$; teste T para amostras relacionadas, $*p<0,05$. C) Taxa de exploração dos objetos antigos não-deslocado e deslocado, MANOVA, $p>0,05$; teste T para amostras relacionadas, $\tau p=0,097$. D) Taxa de exploração dos objetos recentes, MANOVA e Teste T para amostras relacionadas, $p>0,05$.

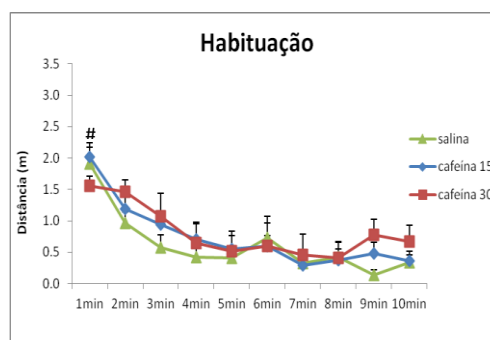
5.2.2. Tarefa de ordem temporal para localizações espaciais

I - Habituação: A habituação dessa tarefa é única para as duas condições no tratamento crônico. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos considerando a distância total percorrida, em metros, de acordo com a ANOVA de uma via ($F_{2,14} = 1,343$, $p=0,293$; Gráfico 19.A). A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito do tempo ao longo da sessão ($F_{9,126} = 27,418$, $p<0,001$); o teste de Bonferroni indicou que o primeiro minuto diferiu dos demais, $p<0,001$ (Gráfico 19.B). Houve também diferença significativa entre os grupos, comparando os tempos gastos nas zonas interna e externa, havendo em todos os grupos maior tempo de exploração da zona externa (Teste T para amostras dependentes, $t_{16} = 34,146$, $p<0,001$; Gráfico 19.C).

A)



B)



C)

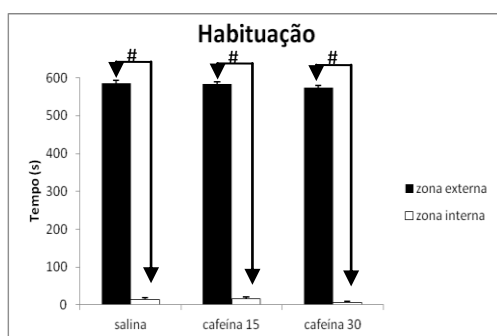
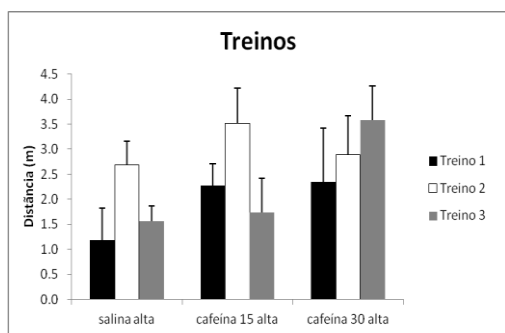


Gráfico 19: Habituação da tarefa de ordem temporal de localizações espaciais. Média +/- erro padrão. A) Distância total, ANOVA de uma via, $p>0,05$. B) Distância por minuto, ANOVA de medidas repetidas, efeito da distância ao longo do tempo e teste de Bonferroni, $\#p<0,001$. C) Tempo gasto por zona, MANOVA, $p>0,05$; teste T para amostras dependentes, $\#p<0,001$.

5.2.2.1. Alta interferência

II - Treinos: Revelou-se uma tendência ao efeito do tratamento na distância percorrida no treino 3, mas não nos demais treinos (MANOVA, treino 1, $F_{2,14}=0,819$, $p=0,461$; treino 2, $F_{2,14}=0,459$, $p=0,641$; treino 3, $F_{2,14}=3,521$, $p=0,058$), com o teste de Bonferroni sugerindo tendência do cafeína 30mg/kg apresentar maior distância percorrida que o salina (Gráfico 20.A). Não houve diferenças estatísticas significativas para os parâmetros de tempo de exploração do objeto por sessão de treino (MANOVA, treino 1, $F_{2,14}=0,070$, $p=0,933$; treino 2, $F_{2,14}=0,733$, $p=0,498$; treino 3, $F_{2,14}=1,405$, $p=0,278$). Entretanto, para o último parâmetro, uma ANOVA de medidas repetidas revelou efeito da interação entre o tempo ativo por treino e o tratamento, sem efeito da do tempo ativo ou tratamento *per se* ($F_{2,28}=3,759$, $p=0,014$), com o teste de Bonferroni sugerindo tendência ao tempo ativo no treino 3 ser superior ao do treino 1, $p=0,083$ (Gráfico 20.B). Os resultados do tempo ativo para as sessões de treinos, juntamente com os dados da distância percorrida nessas sessões sugerem efeito hiperlocomotor do grupo cafeína 30mg/kg.

A)



B)

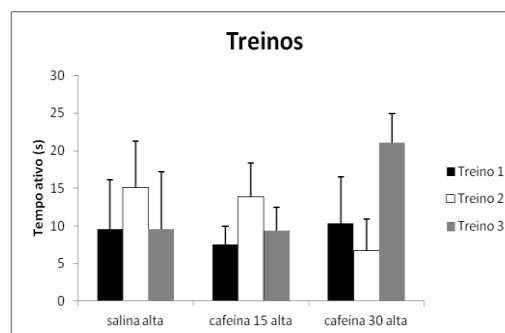
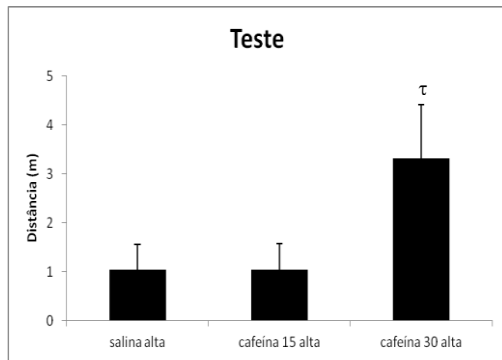


Gráfico 20: Treinos da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, alta interferência. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida em cada treino, MANOVA, $p>0,05$. B) Tempo ativo em cada treino, MANOVA, $p>0,05$.

III – Teste: A ANOVA revelou forte tendência à diferença quanto à distância percorrida entre grupos (Gráfico 21.A; $F_{2,14}= 3,190$, $p=0,072$), essa tendência se mostrou como maior distância percorrida pelo grupo cafeína 30mg/kg em comparação aos demais. O tempo ativo entre grupos não mostrou diferenças significativas (Gráfico 21.B; ANOVA, $F_{2,14}=1,040$, $p=0,379$).

A)



B)

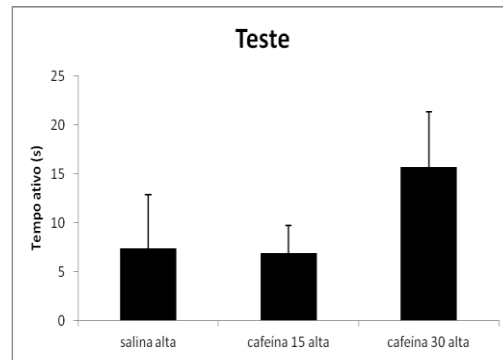
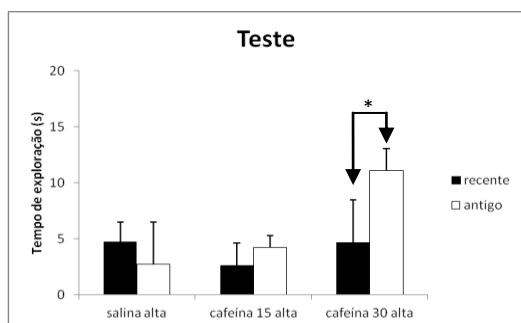


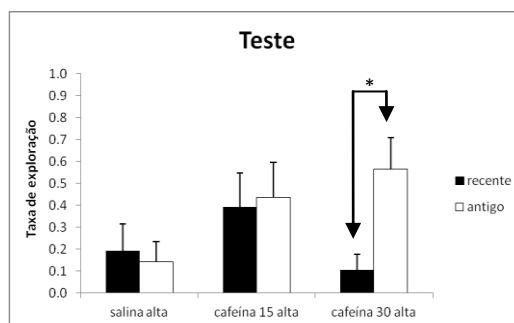
Gráfico 21: Teste da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, alta interferência. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida, ANOVA, τ $p=0,072$. B) Tempo ativo, ANOVA, $p>0,05$.

Para o tempo de exploração dos objetos antigo X recente (Gráfico 22.A), a MANOVA revelou tendência ao efeito do tratamento no tempo de exploração do objeto antigo ($F_{2,14}=2,944$, $p=0,086$); enquanto não houve efeito do tratamento no tempo de exploração do objeto recente ($F_{2,14}=0,218$, $p=0,807$). De acordo com Teste T pareado, não houve diferenças para o tempo de exploração dos objetos nos grupos salina ($t_5=-0,915$, $p=0,402$) ou cafeína 15mg/kg ($t_5=1,100$, $p=0,322$). Houve apenas diferença estatística significativa para o parâmetro de tempo de exploração dos objetos, na sessão de teste, para o grupo cafeína 30mg/kg. Teste T pareado revelou que o tempo de exploração do objeto antigo foi superior ao objeto recente ($t_4=2,775$, $p=0,050$). Quanto à taxa de exploração dos objetos (Gráfico 22.B), a MANOVA não indicou diferença estatisticamente significativa nem para a taxa de exploração do objeto antigo ($F_{2,14}=2,527$, $p=0,116$), nem para a taxa de exploração do objeto recente ($F_{2,14}=1,325$, $p=0,297$). De acordo com o Teste T pareado, não houve diferenças para a taxa de exploração dos objetos nos grupos salina ($t_5=-0,743$, $p=0,491$) ou cafeína 15mg/kg ($t_5=0,162$, $p=0,878$). Houve apenas para o grupo cafeína 30mg/kg, diferença significativa entre as taxas de exploração do objeto antigo e do objeto recente (Teste T pareado, $t_4=3,312$, $p=0,030$). Quanto às taxas de discriminação entre grupos não houve diferenças significativas (Gráfico 22.C; ANOVA, $F_{2,14}=2,033$, $p=0,168$).

A)



B)



C)

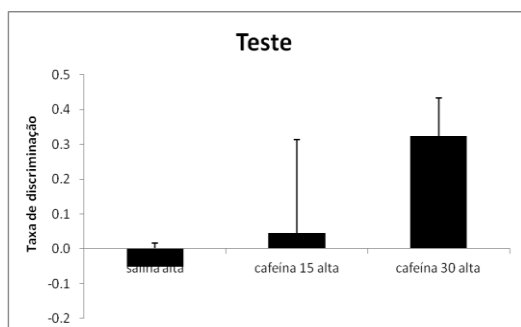


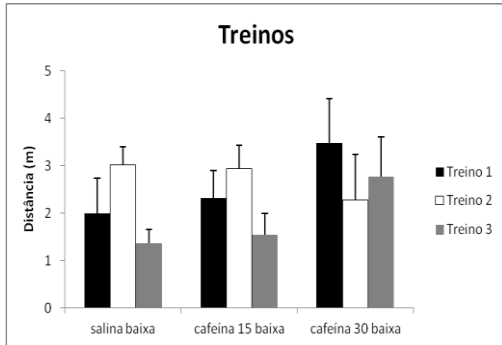
Gráfico 22: Teste da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, alta interferência. Média +/- erro padrão. A) Tempo de exploração dos objetos, MANOVA, $p > 0,05$; Teste T pareado, $*p = 0,05$. B) Taxa de exploração dos objetos, MANOVA, $p > 0,05$; Teste T pareado, $*p < 0,05$. C) Taxa de discriminação entre os objetos, ANOVA, $p > 0,05$.

5.2.2.2. Baixa interferência

II - Treinos: Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa para o efeito do tratamento nos parâmetros de distância percorrida (Gráfico 23.A; MANOVA, treino 1, $F_{2,14} = 0,627$, $p = 0,548$; treino 2, $F_{2,14} = 0,114$, $p = 0,893$; treino 3, $F_{2,14} = 1,701$, $p = 0,218$) ou tempo ativo nos treinos (Gráfico 23.B; MANOVA, treino 1, $F_{2,14} = 0,047$, $p = 0,955$; treino 2, $F_{2,14} = 0,010$, $p = 0,990$; treino 3, $F_{2,14} = 0,182$, $p = 0,835$). A ANOVA de medidas repetidas (Gráfico 23.A) não revelou efeito do tratamento ($F_{2,14} = 0,595$, $p = 0,565$), da distância entre as sessões de treino ($F_{2,28} = 1,392$, $p = 0,265$), nem interação ($F_{4,28} = 1,136$, $p = 0,360$). A ANOVA de medidas repetidas (Gráfico 23.B) também não revelou efeito do tratamento ($F_{2,14} = 0,007$, $p = 0,993$), do tempo ativo entre

as sessões de treino ($F_{1,4;20,4}=0,987$, $p=0,385$), nem interação entre esses fatores ($F_{1,4;20,4}=0,277$, $p=0,891$).

A)



B)

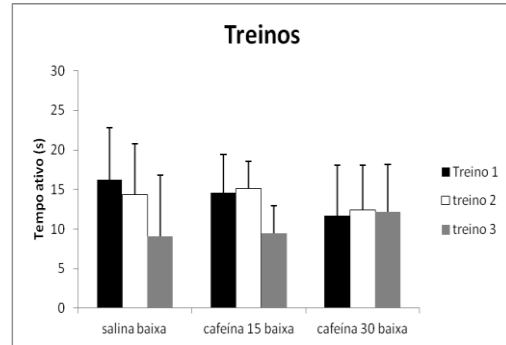
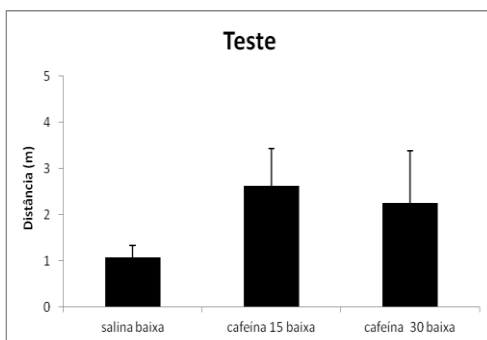


Gráfico 23: Treinos da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, baixa interferência. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida em cada treino, MANOVA e ANOVA de medidas repetidas, $p>0,05$. B) Tempo ativo em cada treino, MANOVA e ANOVA de medidas repetidas, $p>0,05$.

III – Teste: A ANOVA não revelou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à distância percorrida (Gráfico 24.A; $F_{2,14}= 1,356$, $p=0,290$), nem quanto ao tempo ativo (Gráfico 24.B; $F_{2,14}= 0,856$, $p=0,446$).

A)



B)

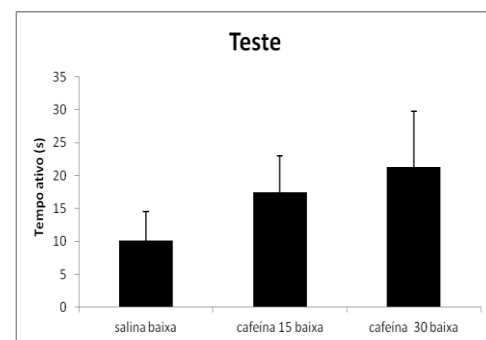
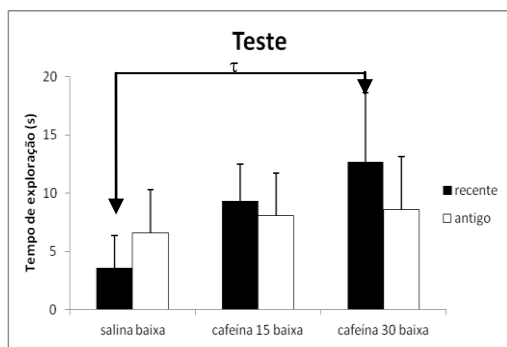


Gráfico 24: Teste da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, baixa interferência. Média +/- erro padrão. A) Distância percorrida, ANOVA, $p>0,05$. B) Tempo ativo, ANOVA, $p>0,05$.

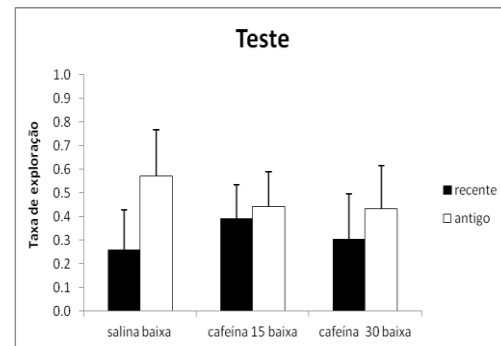
Para os parâmetros de tempo de exploração e taxa de exploração dos objetos antigo X recente não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Gráfico 25.A; MANOVA, tempo de exploração do objeto antigo, $F_{2,14}=2,032$, $p=0,168$; Gráfico 25.B, tempo de exploração do objeto recente, $F_{2,14}=3,314$, $p=0,066$; taxa de exploração

do objeto antigo, $F_{2,14}=0,200$, $p=0,821$; taxa de exploração do objeto recente, $F_{2,14}=0,170$, $p=0,845$). Houve apenas uma tendência à diferença quanto ao tempo de exploração do objeto recente, com o teste de Bonferroni sugerindo que o cafeína 30mg/kg apresentou maior exploração desse objeto que o salina, $p=0,085$. De acordo com Teste T pareado (Gráfico 25.A), não houve diferenças para o tempo de exploração dos objetos em nenhum dos grupos (salina, $t_5=0,966$, $p=0,378$; cafeína 15mg/kg, $t_5=-0,339$, $p=0,748$; cafeína 30mg/kg, $t_4=-0,659$, $p=0,546$). Também não houve diferenças intra grupos para a taxa de exploração dos objetos (Gráfico 25.B; Teste T pareado, salina, $t_5=0,966$, $p=0,378$; cafeína 15mg/kg, $t_5=0,210$, $p=0,842$; cafeína 30mg/kg, $t_4=0,398$, $p=0,711$). Quanto às taxas de discriminação entre grupos não houve diferenças significativas (Gráfico 25.C; ANOVA, $F_{2,14}=0,036$, $p=0,965$).

A)



B)



C)

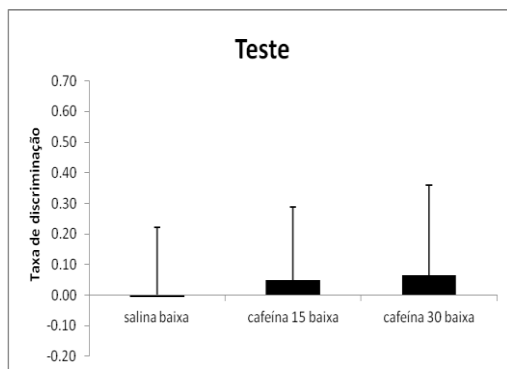


Gráfico 25: Teste da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, baixa interferência. Média +/- erro padrão. A) Tempo de exploração dos objetos, MANOVA, ANOVA de medidas repetidas, $p>0,05$ e Teste T pareado, $\bar{p}=0,085$. B) Taxa de exploração dos objetos, MANOVA, ANOVA de medidas repetidas e Teste T pareado, $p>0,05$. C) Taxa de discriminação entre os objetos, ANOVA, $p>0,05$.

5.2.3. Contagem celular

Com o objetivo de avaliarmos a taxa de incorporação de novos neurônios no giro denteado de animais tratados com cafeína e controles, foram realizadas quantificações do número de células comarcadas para BrdU e NeuN (Figuras 5 e 6). Considerando o número total de células BrdU/NeuN-positivas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Gráfico 26; ANOVA, $F_{2,15}=0,146$, $p=0,865$). De maneira similar, não foram observadas diferenças entre grupos (tabela 1) quando consideramos apenas o número de células comarcadas em cada lâmina do giro denteado (superior e inferior), em cada zona (subgranular ou granular), ou em cada hemisfério (direito ou esquerdo).

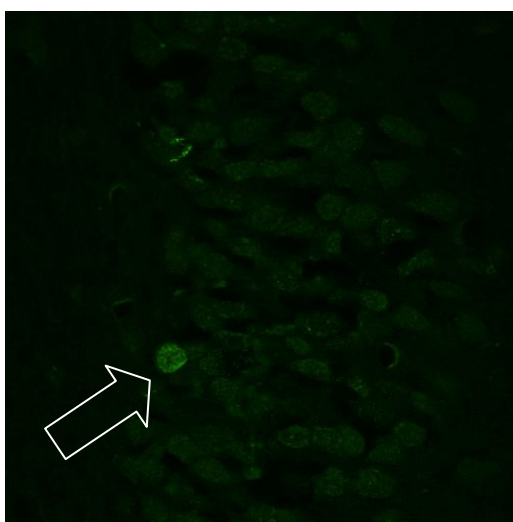


Figura 5: Célula na região do giro denteado, BrdU positiva (seta). Confocal, 40X.

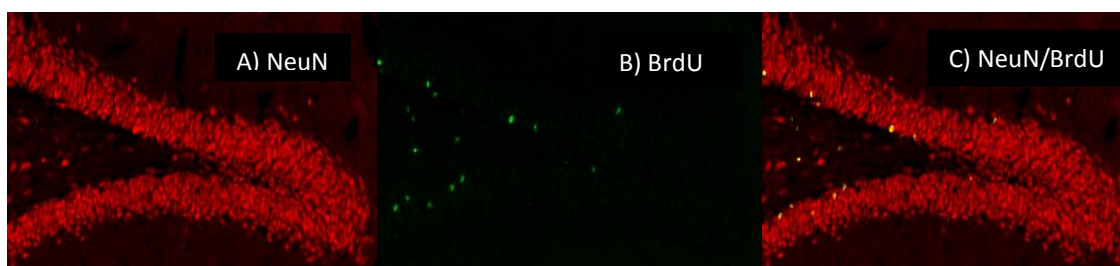


Figura 6: região do giro denteado exibindo marcação com anticorpos fluorescentes para NeuN (A) e BrdU (B). C. células granulares comarcadas para NeuN/BrdU, indicando que marcação de novos neurônios (Microscópio fluorescente, Zeiss, aumento 10X).

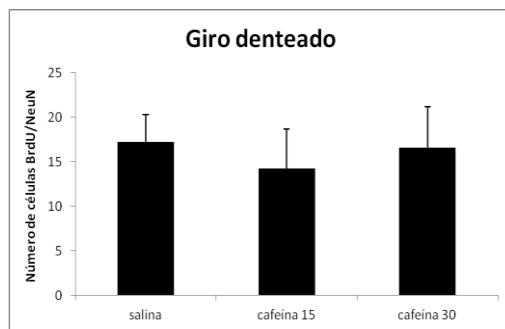


Gráfico 26: Contagem de células comarcadas BrdU/NeuN positivas. ANOVA $p > 0,05$.

Células BrdU/NeuN no giro denteado	F (ANOVA)	p
Lâmina superior	0,259	0,775
Lâmina inferior	0,057	0,945
Zona subgranular	0,028	0,972
Zona subgranular superior	0,004	0,996
Zona subgranular inferior	0,138	0,873
Zona granular	0,378	0,692
Zona granular superior	0,488	0,623
Zona granular inferior	0,252	0,781
Hemisfério direito	0,041	0,960
Hemisfério esquerdo	0,324	0,728

Tabela 1: Contagem celular no giro denteado. Para todos os parâmetros analisados entre grupos, ANOVA, $p > 0,05$.

Em seguida foram realizados testes de correlação bivariada entre o número de células BrdU/NeuN e o comportamento de exploração de objetos antigos: taxa de exploração dos antigos (Gráfico 27; $r = -0,065$, $p = 0,797$) e antigo não-deslocado (Gráfico 28; $r = 0,036$, $p = 0,887$) na tarefa episódica de reconhecimento de novidade espacial e temporal; bem como, taxa de exploração do objeto antigo (Gráfico 29; $r = -0,226$, $p = 0,382$) na tarefa episódica de ordem temporal de localizações espaciais. Não foi verificada nenhuma correlação entre a quantidade de neurônios novos e o desempenho na discriminação de objetos.

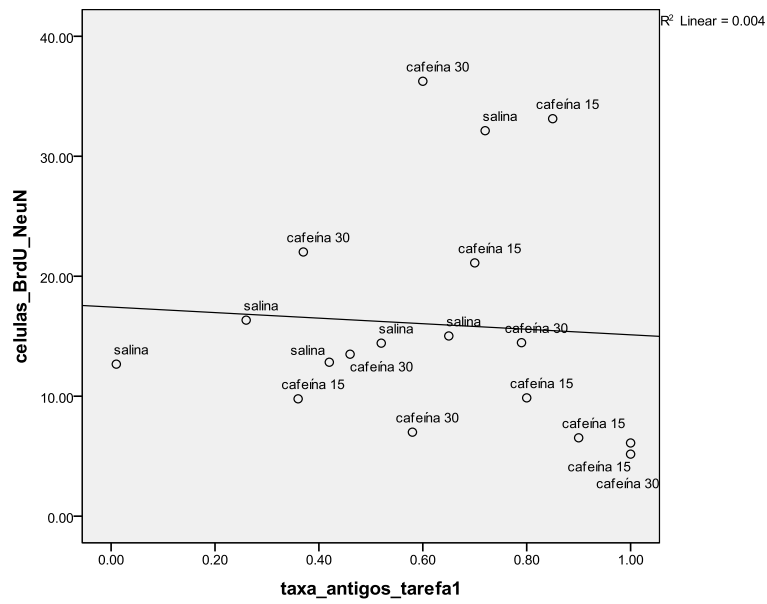


Gráfico 27: Dispersão dos dados relacionado o número de células BrdU/NeuN geradas no giro denteado com o desempenho da taxa de exploração dos objetos antigos na tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal, em cada caso.

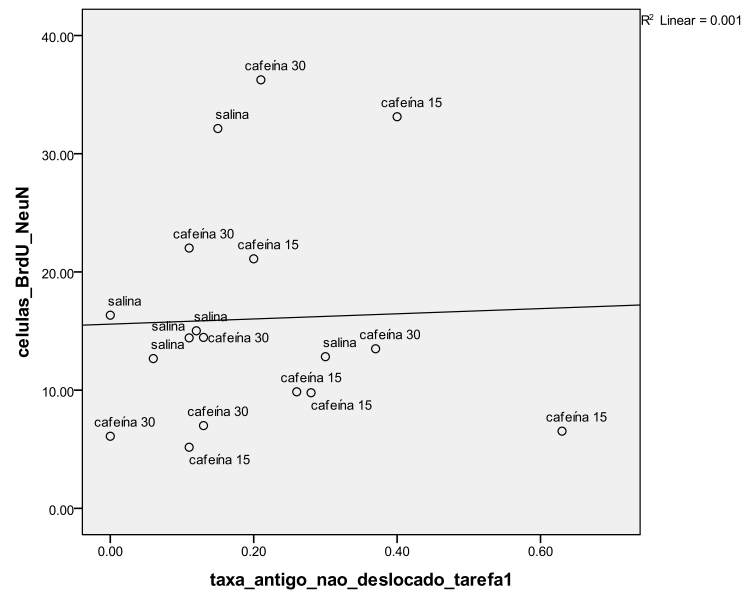


Gráfico 28: Dispersão dos dados relacionado o número de células BrdU/NeuN geradas no giro denteado com o desempenho da taxa de exploração do objeto antigo não-deslocado na tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal, em cada caso.

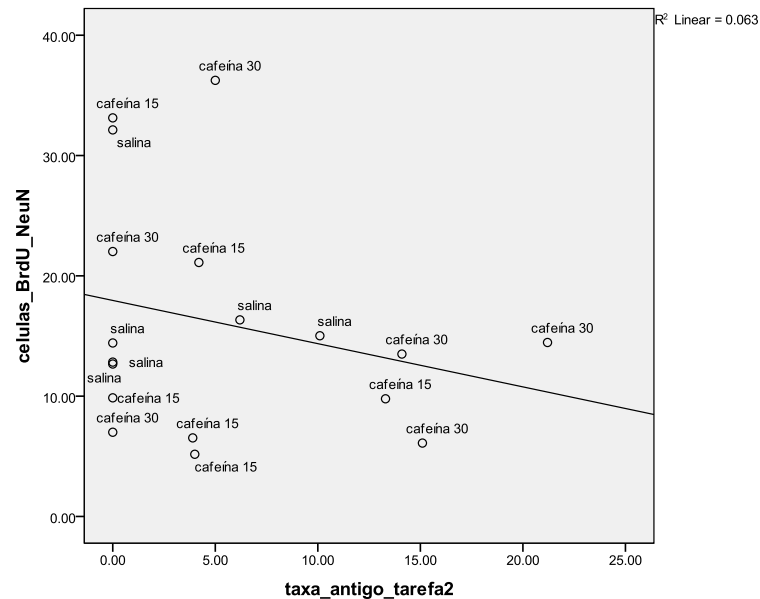


Gráfico 29: Dispersão dos dados relacionado o número de células BrdU/NeuN geradas no giro denteado com o desempenho da taxa de exploração do objeto antigo na tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, em cada caso.

6. Discussão

As tarefas comportamentais utilizadas envolveram aspectos da memória tipo-episódica, ao expor os animais a reconhecimentos de novidades espaço-temporais, além de serem dependentes de hipocampo, permitindo avaliações farmacológicas e histológicas conforme propostas.

A ação aguda da cafeína pode afetar, de maneira positiva, a função cognitiva, ao reforçar o aprendizado e a memória. Seus efeitos benéficos, provavelmente são relatados, em parte, devido ao aumento da vigilância e da estimulação (Fisher & Guillet, 1997). Em nosso estudo, o tratamento agudo não demonstrou diferença entre os grupos quanto à distância total percorrida na habituação (Gráfico 1.A), o que era esperado, já que os grupos receberam o tratamento somente no dia seguinte, nos dias de treinos das tarefas. Houve efeito de redução da distância percorrida ao longo do tempo, indicando

habituação ao campo aberto (Gráficos 1.B, 6.B, 10.B); bem como maior exploração da zona externa em comparação à interna, em todos os grupos, em todas as sessões de habituação das tarefas e condições, o que é um comportamento natural de preferência dos animais (Gráficos 1.C, 6.C, 10.C; Walsh & Cummins, 1976).

No dia seguinte à sessão de habituação, os animais foram submetidos aos treinos da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal ou de uma das duas condições da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais. Todos os animais receberam injeções 30 minutos antes dos primeiros treinos, de acordo com a literatura (Angelucci, et al., 1999; Halldner, et al. 2004; Silva & Frussa-Filho, 2000). No que se refere à tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, quanto à distância percorrida no treino 1 (Gráfico 2.A), mas houve diferença no treino 2 (Gráfico 3.A), com os grupos cafeína 15mg/kg e 30mg/kg apresentando hiperlocomoção. Quanto ao tempo ativo nas duas sessões de treino (Gráficos 2 e 3.B), também não foi averiguada diferenças estatisticamente significativa entre os grupos. Entretanto, a taxa de exploração dos objetos revelou efeito desse parâmetro, sem efeito de tratamento ou interação, no treino 1 (Gráfico 2.C). Curiosamente, todos os grupos exploraram mais o objeto 4 que os objetos 2 e 3, o que provavelmente se deveu à posição do objeto 4 na extremidade da disposição dos objetos e não ao tratamento. Na sessão de teste da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para quaisquer comparações quanto à distância, ao tempo ativo (Gráfico 4), ou ao padrão de exploração (Gráfico 4 e 5), quer dizer, nenhum dos grupos apresentou desempenho adequado, não sendo vistas diferenças entre o tempo ou a taxa de exploração dos objetos antigos em detrimento dos recentes, ou do objeto antigo deslocado em detrimento do não-deslocado. Entretanto pudemos destacar uma tendência do grupo salina agudo a apresentar maior exploração do objeto antigo deslocado em comparação ao não-deslocado, o que não é evidente nos grupos cafeína 15mg/kg e 30mg/kg, nos quais as taxas de exploração dos dois objetos foram equivalentes (Gráfico 5.C). Esse resultado sugeriu uma discriminação espacial pelo grupo salina que não foi averiguada nos demais. A ausência de significância pode ser devido ao baixo número amostral por grupo (N=5).

No trabalho de Barbosa, et al. (2010) foram vistas diferenças significativas na taxa de exploração de objetos antigos em comparação aos recentes e antigo não-

deslocado em comparação aos recentes, considerando o tempo total de teste. Por outro lado, a maior exploração do antigo deslocado em relação ao não-deslocado só foi vista no primeiro minuto da tarefa, tanto para o grupo não submetido a qualquer injeção, como para o grupo salina que recebeu uma injeção i.p. pós-treinos. Esses resultados prévios diferem dos nossos resultados, os quais não indicaram preferência temporal ou espacial estatisticamente significativa pelo grupo salina, apenas uma tendência em relação a discriminação espacial. Para os grupos tratados com cafeína, as comparações entre taxas de exploração de antigos X recentes, média dos recentes X antigo não-deslocado e antigo deslocado X não-deslocado foram equivalentes, indicando uma exploração ao acaso, o que se traduz num prejuízo de desempenho na discriminação dos objetos. Esse resultado é comparável àquele obtido para o grupo que recebeu uma injeção de escopolamina (antagonista colinérgico) pós-treinos, nos quais a consolidação foi prejudicada (Barbosa, et al., 2010).

Kart-Teke, et al. (2006) investigaram o efeito do estresse agudo de uma injeção de salina antes da primeira sessão de treino, assim como fizemos em nosso tratamento agudo. Kart-Teke, et al. verificaram que os animais submetidos a tal tratamento tiveram prejuízo na execução do teste, não discriminando temporalmente, nem espacialmente os objetos. Tem sido relatado que o estresse de uma simples injeção de salina (Nagel & Huston, 1988) ou outras manipulações estressantes, como a contenção, podem prejudicar a memória (Baker & Kim, 2002). O mesmo trabalho avaliou se o efeito de uma droga promnética (D-cicloserina - DCS) poderia reverter ou melhorar o déficit promovido pelo estresse da injeção. O DCS é um agonista parcial do sítio de glicina de receptores NMDA, facilitando a frequência de abertura do canal (Johnson & Ascher, 1987), tendo efeitos promnéticos em ratos e camundongos (Hughes, 2004; Land & Riccio, 1999; Lelong, et al. 2001; Matsuoka & Aigner, 1996; Pussinen & Sirvio, 1999; Quartermain, et al. 1994) e revertendo déficits de memória (Ohno & Watanabe, 1996; Pitkanen, et al. 1995; Zajackowski & Danysz, 1997). Seus efeitos são dependentes dos níveis de ansiedade suscitado nos animais (Ho, et al., 2005). Como os receptores NMDA estão envolvidos no reconhecimento de objeto-lugar e na memória para ordem temporal, DCS poderia reforçar a memória alterando o padrão obtido com os animais estressados pela injeção. É possível que em a resposta ao estímulo estressor (injeção) houvesse ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) induzindo à liberação de hormônios do estresse (Roosendaal, 2002) e, permitindo associar elevada ansiedade

com prejuízo de memória (Smith, et al., 1997; Silva & Frussa-Filho, 2000). Os resultados de Kart-Teke para o tratamento agudo com DCS indicaram maior exploração do objeto antigo não-deslocado em comparação aos recentes e não houve diferença de exploração entre antigo deslocado e não-deslocado. Portanto, houve melhora do aspecto temporal da memória episódica, mas não o espacial comparado ao grupo salina tratado agudamente. Nossos resultados não verificaram melhor exploração dos grupos cafeína tratados agudamente em comparação ao grupo salina agudo, indicando que embora a cafeína possa ter alterado os níveis de ansiedade, como proposto para a ação promnéstica de DCS (Ho, et al., 2005), não houve reversão do estresse agudo da injeção. Ao contrário, nosso grupo salina agudo pareceu discriminar levemente o objeto antigo deslocado em relação ao não-deslocado, sugerindo discriminação espacial que não foi vista nos grupos cafeína; adicionando a esse fato, a ausência de discriminação temporal em quaisquer grupos tratados agudamente.

Na condição de alta interferência da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais, os resultados da habituação corroboraram os da tarefa acima (Gráfico 6). Além disso, vimos que o grupo cafeína 15mg/kg apresentou maior locomoção que o grupo salina no primeiro treino e maior locomoção que o controle e o cafeína 30mg/kg nos treinos seguintes (Gráfico 7.A). Esses dados sugerem efeito hiperlocomotor da dose baixa de cafeína, mas não da dose elevada, o que poderia ser explicado por uma possível alteração no nível de ansiedade. A dose de 30mg/kg podia ter suscitado maior ansiedade nos animais e reduzido seu comportamento exploratório (Silva & Frussa-Filho, 2000). Ao mesmo tempo, todos os grupos apresentaram maior locomoção no treino 1 que nos demais (Gráfico 7.A), bem como maior tempo ativo no treino 1 que no treino 3 (Gráfico 7.B), indicando habituação ao campo. Os dados da condição anterior para a habituação foram reproduzidos na condição de baixa interferência da tarefa (Gráfico 10); ao mesmo tempo, o grupo cafeína 15mg/kg apresentou maior locomoção que o grupo salina, nos treinos, corroborando o efeito hiperlocomotor dessa dose também nessa condição (Gráfico 11.A). Quanto à avaliação dos tempos ativos nos treinos não houve diferenças de exploração entre os grupos (Gráfico 11.B).

Na sessão de teste da condição de alta interferência da tarefa de ordem temporal para localizações espaciais houve diferença quanto à distância total percorrida, com o grupo cafeína 15mg/kg apresentando maior locomoção que o grupo controle, já o

caféina 30mg/kg apresentou uma tendência a maior locomoção que o controle, apesar de não significativo (Gráfico 8.A). Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os grupos quanto aos tempos ativos (Gráfico 8.B). O grupo caféina 15mg/kg apresentou maior taxa de exploração do objeto recente, mas não do antigo comparado ao grupo controle (Gráfico 9.B), enquanto não houve diferença entre os tempos ativos para ambos os objetos entre grupos (Gráfico 9.A). Porém, houve tendência do grupo salina apresentar maiores taxa e tempo de exploração do objeto antigo que do recente, o que não foi visto nos grupos tratados com caféina, indicando discriminação apenas pelo grupo controle (Gráfico 9.A e B). Não houve diferença entre os grupos tratados em relação aos controles quanto à taxa de discriminação entre os objetos (Gráfico 9.C). O aumento da atividade locomotora pela caféina (Nehlig, et al., 1984, 1986), na dose de 15mg/kg, não se refletiu na maior exploração do objeto antigo, apenas na do recente, sugerindo prejuízo na discriminação. A alteração nos níveis de ansiedade pela caféina também poderia explicar o déficit de discriminação em relação ao controle (Smith, et al., 1997; Silva & Frussa-Filho, 2000), assim como na tarefa anterior. Já com relação à condição de baixa interferência dessa tarefa não houve qualquer diferença entre quanto à distância ou ao tempo ativo, bem como também não houve diferenças quanto ao padrão de exploração entre grupos, na sessão de teste (Gráficos 12 e 13). No entanto, a avaliação da taxa de exploração dos objetos intra grupos (Gráfico 13.B) revelou uma tendência a maior exploração do objeto antigo em relação ao recente pelos grupos salina e caféina 30mg/kg, enquanto as taxas de exploração de ambos os objetos pelo caféina 15mg/kg foi similar. Tais resultados acompanham aqueles exibidos pelo tempo de exploração desses objetos, porém a tendência não é revelada, devido ao baixo número amostral e elevada variância. Ao contrário, poderíamos sugerir um déficit induzido pela administração aguda de caféina se levarmos em conta a tendência à discriminação exibida pelo grupo controle, quanto à dose de 15mg/kg de caféina. Já quanto à dose de 30mg/kg, apesar de seu padrão semelhante ao grupo salina, esse resultado podia ser decorrente de alterações no nível de ansiedade, entretanto nosso aparato não foi capaz de demonstrá-las.

Vários outros estudos mostraram também efeitos positivos da caféina em animais saudáveis. Angelucci, et al., (2002) verificaram que a administração aguda de baixa dose de caféina melhora a memória de retenção, mas não a de aquisição ou de

trabalho, pelo menos na tarefa de labirinto aquático de Morris, sugerindo efeito benéfico na cafeína em situações espaciais/relacionais, ou seja, em memórias dependentes do hipocampo. A administração aguda melhorou o desempenho em tarefas de esQUIVA inibitória em camundongos (Cestari & Castellano, 1996) e ratos (Angelucci, et al., 1999); labirinto multi-câmara em camundongos (Yonkov & Roussinov, 1983) e esQUIVA ativa em ratos (Gevaerd, et al., 2001; Yonkov, 1984).

Rogers & Kesner (2004) concluíram que níveis adequados de acetilcolina são necessários para codificação de novos contextos espaciais, ou melhor, de tarefas hipocampo-dependentes, ao passo que o decréscimo desse neurotransmissor é necessário para recordação do aprendizado prévio. Tal estudo mostra que antagonistas colinérgicos como a cafeína, ao ser administrada pré-treino, aumentaria os níveis de acetilcolina antes da aquisição e melhora a memória, enquanto, sua administração na fase de recordação tenderia a elevar os níveis colinérgicos prejudicando a memória. Seus achados contrariam estudos anteriores (Angelucci, et al., 2002; Yonkov, 1985; Cestari & Castellano, 1996; Yonkov & Roussinov, 1983; Furusawa, 1991; Izquierdo, 1979; Sansone, et al., 1994; Smith, et al., 1994; Terry & Phifer, 1986; Loke, 1988; Erikson, et al., 1985). Nosso estudo mostrou que ambas as doses utilizadas não foram efetivas na execução das tarefas tipo-episódicas não sendo observada melhora cognitiva promovida pela cafeína administrada agudamente, antes dos treinos.

Avaliando os parâmetros da tarefa de reconhecimento de novidade espacial e temporal (Barbosa, et al., 2010) aplicados ao tratamento crônico pôde-se verificar que houve habituação dos animais expostos ao campo aberto circular, uma vez que houve redução significativa da distância total percorrida ao longo do tempo de sessão de 10 minutos (Gráfico 14.B). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à distância total percorrida durante a habituação (Gráfico 14.A), indicando que a cafeína administrada cronicamente não promoveu efeito sobre a atividade motora (Nehlig, et al., 1992; Nikodijevic, et al., 1993; Kaplan et al., 1993). Concomitantemente, todos os grupos apresentaram maior tempo de exploração da zona externa em relação à interna (Gráfico 14.C), sugerindo que o comportamento natural dos animais de exploração próxima às paredes do campo (Walsh & Cummins, 1976) não foi alterado pela cafeína. Seria possível esperar que houvesse diferença entre os grupos cafeína comparados ao controle; devido a sua já descrita ação ansiogênica (Bourin, et al., 1998; Griffiths, et al.,

1986), os grupos cafeína poderiam explorar mais a zona externa que o controle. Por outro lado, como o tratamento foi crônico, o efeito ansiogênico podia ter sido tolerado (Arendash, et al., 2006; Bhattacharya, et al., 1997; Corradetti, et al., 1986; Chou, et al., 1985). A administração crônica de cafeína produz uma regulação positiva no número de receptores de adenosina e decréscimo na potência da cafeína, descrevendo um mecanismo de tolerância (Hawkins, et al. 1988; Johansson, et al. 1993). Entretanto, outra possibilidade seria a sugestão de que o aparato não foi capaz de exibir a alteração nos níveis de ansiedade. Uma vez que tais níveis parecem ter sido alterados devido à diferença nos desempenho entre os grupos. Alterações nos níveis de ansiedade podem ser verificadas em aparatos como o labirinto em cruz, pela esquiva dos braços abertos (Lister, 1987). Apesar de nosso trabalho não ter demonstrado elevação da ansiedade pela cafeína, o campo aberto tem sido utilizado com a finalidade de avaliar ansiedade (ver revisão de Prut & Belzung, 2003).

Os parâmetros de tempo de exploração dos objetos (Gráficos 15.B e 16.B) e distância total percorrida (Gráficos 15.A e 16.A), durante as sessões de treinos, não revelaram diferenças significantivas entre os grupos, indicando que não houve preferência por nenhum dos objetos conforme esperado. Como não houve diferença entre os grupos para a distância total percorrida nos treinos, assim como na habituação, não houve efeito hiperlocomotor da cafeína administrada cronicamente. O uso prolongado de cafeína pode causar decréscimo na atividade locomotora (Nehlig, et al., 1992; Nikodijevic, et al., 1993; Kaplan et al., 1993), enquanto o tratamento agudo eleva esse comportamento (Nehlig, et al., 1984, 1986), conforme verificamos no nosso trabalho. Já para a taxa de exploração dos objetos houve diferença significativa entre a taxa de exploração do objeto 4 em relação às taxas dos objetos 2 e 3, apenas no treino 1 (Gráfico 15.C), o que poderia ser explicado pela posição do objeto 4 na extremidade da disposição dos objetos. Ao mesmo tempo, como não houve diferença entre os grupos, ou seja, todos os grupos exploraram mais o objeto 4, então tal preferência se deu ao acaso e não devido ao tratamento ou a alguma variável dependente; assim como foi averiguado no tratamento agudo. Quanto ao treino 2, não houve diferença entre as taxas de exploração dos objetos (Gráfico 16.C) e, portanto, nenhuma preferência foi revelada, conforme esperado.

Na sessão de teste, verificamos que não houve hiperlocomção dos grupos cafeína, pois não foi observada diferença entre os grupos para a distância percorrida

(Gráfico 17.A). Houve maior exploração de todos os objetos (tempo ativo; Gráfico 17.B) pelo grupo cafeína 30mg/kg em relação aos demais. Entretanto esse dado não se traduziu em discriminação dos objetos, tal grupo explorou mais um dos objetos recentes (recente 1) e o antigo deslocado, que foram dispostos próximos, na sessão de teste (Gráfico 17.C). Portanto, o aumento do tempo ativo pareceu ser explicado pela proximidade dos objetos. Ao mesmo tempo, houve uma maior taxa de exploração dos objetos antigos em comparação à taxa de exploração dos objetos recentes (Gráfico 18.A), bem como maior taxa de exploração do objeto antigo não-deslocado em relação a média dos recentes (Gráfico 18.B), apenas para o grupo cafeína que foi tratado com doses diárias de 15mg/kg, indicando que somente a baixa dose foi capaz de promover discriminação dos objetos. Esse achado pode ser considerado como melhor desempenho no aspecto temporal da memória episódica. A maior exploração de objetos antigos em relação a recentes é um comportamento esperado (Dix & Aggleton, 1999) que pôde ser verificado apenas no grupo cafeína 15mg/kg. Uma possibilidade para a discriminação não ter sido averiguada no grupo salina é o fato de que o estresse das injeções pode ter prejudicado o desempenho da tarefa (Kart-Teke, et al. 2006; 2007; Barbosa et al. 2010), uma vez que a tarefa havia sido anteriormente padronizada sem tratamentos farmacológicos (Dere, et al. 2005a, b; Kart-Teke, et al. 2006) ou com uma injeção aguda (Barbosa et al. 2010; Kart-Teke, et al. 2006). Segundo Dere, et al. (2005a) o estresse, tanto agudo, quanto crônico pode desempenhar um papel prejudicial em tarefas de memória tipo-episódica. Já o grupo que recebeu dose baixa de cafeína teve seu desempenho melhorado, podendo a cafeína ter agido como reforçador cognitivo em condições de estresse (ver revisão de Fredholm, et al., 1999). Embora Smith, et al. (1997) não atestem evidência para isso, o estudo de Temple, et al. (1997) mostrou que a cafeína melhorou significativamente o desempenho em teste de vigilância após tarefas estressantes, em humanos.

Ainda na sessão de teste, não houve diferença significativa entre as taxas de exploração do objeto antigo deslocado e do não-deslocado (Gráfico 18.C), dentre nenhum dos grupos, indicando que não houve melhora do aspecto espacial da memória episódica, fosse considerando o tempo total da sessão, ou a cada minuto, a qual poderia revelar um decréscimo da exploração ao longo do tempo (habituação), como foi visto no trabalho de Barbosa, et al. (2010), com maior taxa de exploração do objeto antigo deslocado em relação ao não-deslocado apenas no primeiro minuto do teste. No nosso

trabalho, houve apenas uma tendência dos grupos apresentarem uma maior exploração do antigo deslocado em relação ao não-deslocado, visto principalmente no grupo salina, cuja a ausência de efeito significativo deve ser decorrente do pequeno número amostral e elevada variância. A taxa de exploração de cada objeto recente serve para fazer um controle da exploração geral dos objetos e um controle para comparação do aspecto temporal da memória; não devendo haver preferência por nenhum dos objetos recentes, já que ambos são iguais e foram apresentados ao mesmo tempo. No nosso estudo, como esperado, não foi encontrada diferença estatística significativa entre as taxas de exploração dos objetos recentes entre si (Gráfico 18.D), apesar de que o grupo cafeína 30mg/kg pareceu apresentar uma preferência por um dos recentes. Com relação ao padrão de exploração dos animais esperava-se que eles explorassem mais os objetos antigos em comparação aos recentes, mais o antigo não-deslocado em relação aos recentes, bem como apresentassem maior exploração do antigo deslocado em relação ao não-deslocado, conforme estudos anteriores (Dere, et al., 2005a, 2005b; Ennaceur & Delacour, 1988; Ennaceur et al., 1997; Mitchell & Laiacona, 1998; Hannesson, et al., 2004; Hotte, et al., 2005).

No presente estudo, observamos preferência temporal do objeto antigo não-deslocado em comparação a recentes, pelo grupo cafeína 15mg/kg e, uma tendência do grupo salina à preferência espacial, explorando mais o antigo deslocado que o não-deslocado. No caso do estudo de Kart-Teke, et al. (2006), os animais que exibiram apenas preferência temporal não tinham passado por qualquer procedimento de injeção ou foram tratados com DCS (agonista NMDA), enquanto houve prejuízo no grupo salina. No estudo de Kart-Teke, et al. tanto o fármaco quanto o veículo foram administrados intraperitonealmente, 30 minutos antes do primeiro treino. Assim, nosso estudo e o de Kart-Teke, et al. mostraram que tanto a cafeína na dose de 15mg/kg, administrada cronicamente, como DCS, administrado agudamente reverteram o efeito de estresse da injeção. Em ambos os estudos, os animais passaram por procedimentos de manipulação, porém no estudo de Kart-Teke, et al., os animais passaram pelos procedimentos experimentais durante a fase escura do ciclo de luz, o que pode ter elevado a maior motivação para exploração.

Além disso, a administração crônica pré-teste de cafeína (15mg/kg, s.c.), em ratos, melhorou a memória de consolidação em campo aberto (Molinengo, et al., 1995). Costa, et al. (2008b) encontrou que a administração sub-crônica de cafeína (10mg/kg,

i.p.), durante quatro dias, melhorou o desempenho de camundongos em tarefa de reconhecimento de objetos.

A tarefa tipo-episódica de ordem temporal para localizações espaciais aplicada ao tratamento crônico mostrou resultados semelhantes à tarefa anterior para a habituação. Não houve efeito hiperlocomotor da cafeína (Nehlig, et al., 1992; Nikodijevic, et al., 1993; Kaplan, et al., 1993), pois não houve diferenças entre os grupos para o parâmetro de distância total (Gráfico 19.A). Houve habituação ao novo campo aberto (quadrado), pois houve redução da exploração ao longo de uma sessão de 10 minutos (Gráfico 19.B). A cafeína também não exibiu efeito sobre a ansiedade, em qualquer dose, já que todos os grupos apresentam maior tempo de exploração da zona externa em relação à interna (Gráfico 19.C).

Na condição de alta interferência dessa tarefa, não houve diferenças significativas entre os grupos, nas sessões de treinos. Quanto à distância percorrida (Gráfico 20.A) houve uma forte tendência do cafeína 30mg/kg apresentar maior exploração do meio que o salina no terceiro treino. O terceiro treino mostrou também tendência a apresentar maior tempo ativo que o primeiro (Gráfico 20.B). A interpretação desses resultados sugeriu efeito de habituação com as re-exposições ao campo a cada sessão de treino, mas com manutenção elevada no terceiro treino, comparado ao primeiro, devido à hiperlocomoção do grupo cafeína 30mg/kg (Nehlig, et al., 1992; Nikodijevic, et al., 1993; Kaplan et al., 1993). Já para a condição de baixa interferência não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa para os parâmetros de distância percorrida (Gráfico 23.A) e tempo ativo (Gráfico 23.B), nas sessões de treinos, entre os grupos. Isso corrobora para o fato de ter havido habituação ao campo com redução da exploração, decorrente de re-exposições. Em ambas as condições, no tratamento crônico, foram utilizados os mesmos animais, que também passaram pela tarefa de reconhecimento de novidade temporal e espacial. Além disso, vale destacar que cada animal passou pelas duas condições e que parte dos animais foi submetida à condição de alta interferência, enquanto a outra parte foi sujeita à condição de baixa interferência, no mesmo dia. No dia seguinte, foram sujeitos à condição pela qual ainda não tinham passado.

Avaliamos os parâmetros comportamentais do tempo de exploração dos objetos no teste, apresentados nas posições do primeiro e terceiro treinos, respectivamente, o mais antigo e o mais recente temporalmente. Foi visto que entre os grupos, na condição

de alta interferência (objetos mais próximos), houve maior distância percorrida (Gráfico 21.A) pelo grupo cafeína 30mg/kg, sem diferenças estatisticamente significativas para o tempo ativo (Gráfico 21.B). Também não houve diferenças quanto à taxa de discriminação entre os objetos. Apesar disso, houve maior exploração do objeto antigo em comparação ao recente pelo grupo cafeína 30mg/kg (Gráfico 22.A e B). Esse padrão de exploração é o esperado, havendo preferência pelo objeto mais antigo temporalmente em relação ao mais recente (Hunsaker & Kesner, 2008). Em outras palavras, a novidade temporal seria representada pelo objeto apresentado mais distante no tempo. A tarefa designa que a primeira localização espacial é preferencialmente recordada em comparação à última localização apresentada, pois a recordação proveniente do córtex que exibe traço de memória mais forte é a da primeira localização. O comportamento animal reflete a re-exploração do objeto cuja localização foi mais consolidada, suscitando a preferência pela primazia, em vez da recência, em animais com hipocampo intacto (Hunsaker, et al., 2008; Hunsaker & Kesner, 2008). Ao mesmo tempo, nenhum dos demais grupos, em nosso experimento, apresentou esse padrão de exploração dos objetos no teste, sugerindo que a alta dose de cafeína pôde melhorar o padrão espaço-temporal da memória episódica. Além disso, como nem o grupo controle apresentou o comportamento esperado é possível, mais uma vez, que o estresse crônico das injeções tenha prejudicado a execução da tarefa. A cafeína agindo como reforço cognitivo também não conseguiu estabelecer o padrão comportamental esperado nessa condição de alta dificuldade, na dose de 15mg/kg. Houve reforço cognitivo, revertendo o efeito estressor (ver revisão de Fredhoom, et al. 1999; Temple, et al., 1997), apenas na dose de 30mg/kg, portanto, em condições de maior dificuldade de desempenho cognitivo, altas doses de cafeína podem ser efetivas em detrimento de doses mais baixas (Kenemans & Lorist, 1995; Lieberman, et al., 1987; Lieberman, et al., 2002; Wesensten, et al., 2005).

Na condição de baixa interferência, não houve qualquer diferença estatística significativa entre os grupos, quanto à distância, tempo ativo ou exploração dos objetos (Gráficos 24 e 25). Houve apenas uma tendência a maior tempo de exploração do objeto recente pelo grupo cafeína 30mg/kg comparado ao salina. Os grupos cafeína apresentaram exploração similar entre os objetos, não havendo discriminação, enquanto o grupo salina tendeu a apresentar maior exploração do objeto na posição antiga que na recente, conforme esperado (Gráfico 25.A e B). O desempenho melhorado pela cafeína

na dose de 30mg/kg, somente na condição de alta interferência, em detrimento da condição de baixa interferência, sugere que elevada dose de cafeína parece ser mais efetiva em condições de maior dificuldade.

A tarefa de ordem temporal para localizações espaciais foi desenvolvida para o estudo do processamento temporal de localizações espaciais e de lesões hipocampais. O estudo de Hunsaker & Kesner (2008) mostrou que animais com lesões no giro denteado, que é responsável pelo processo de separação de padrões⁴ espaciais (Morris & McNaughton, 1987; Rolls & Treves, 1998; Rolls & Kesner, 2006), apresentaram dificuldade em realizar a tarefa com altos níveis de interferência espacial (objetos próximos), mas a realizaram normalmente em baixos níveis de interferência (objetos afastados). Gilbert et al. (2001) e Goodrich-Hunsaker et al. (2008) demonstraram que animais com lesões no giro denteado tem dificuldade de discriminar localizações espaciais quando separadas por menos que 68 cm, reafirmando a ação de separação de padrões⁴ dessa região hipocampal. Assim, nosso estudo propõe que a cafeína na dose elevada tenha agido reforçando a memória tipo-episódica, ao interferir no processamento de separação de padrões⁴, na condição de alta interferência. Já que somente esse grupo, nessa condição, conseguiu discriminar espacialmente objetos em função do tempo em que foram apresentados. Assim, supõe-se que o tratamento prolongado com dose elevada de cafeína influenciou positivamente a ação do giro denteado.

A redução da exploração central em relação à locomoção total ou aumento da latência para entrar no centro, são indicativos de ansiedade; esses parâmetros podem ainda ser alterados por fármacos (ver revisão de Prut & Belzung, 2003). Nos presentes experimentos, não foi verificada alteração do comportamento dos animais em virtude do tratamento com cafeína, apesar desse fármaco ser comprovadamente ansiogênico (Bourin, et al, 1998; Griffiths, et al., 1986). Foi sugerido que elevados níveis de ansiedade promovidos pela cafeína pudessem reduzir a atividade locomotora em camundongos (Silva & Frussa-Filho, 2000). No estudo de Vila-Luna e colaboradores (2012), observou-se padrões similares de exploração do campo aberto, tanto de animais que receberam tratamento oral e prolongado com baixa dose de cafeína (5mg/kg/dia, durante 6 meses), como de animais controle jovens que consumiram apenas água, não havendo desenvolvimento de ansiedade em espaços abertos. Ao mesmo tempo, os

grupos cafeína não apresentaram diferenças quanto à distância total percorrida nos campos abertos, nas sessões de habituação das tarefas aqui utilizadas, comparativamente ao controle. Isso indica ausência do efeito hiperlocomotor promovido pelo fármaco (Nehlig, et al., 1992; Nikodijevic, et al., 1993; Kaplan et al., 1993). A atividade locomotora em campo aberto reflete a exploração da novidade do meio, que decresce com o tempo de exposição a ele (Dunne, et al., 2007), seguindo para a locomoção basal em animais habituados (Zhang, et al., 2011). A redução da distância percorrida ao longo do tempo na exposição aos campos abertos, durante as sessões de habituação, indica que assim como nas tarefas originais, apenas uma sessão de habituação é necessária para execução dos nossos experimentos (Barbosa, et al. 2010; Hunsaker & Kesner, 2008). A cafeína exerce aumento da atividade locomotora em campo aberto (Kuribara, et al., 1992; Nehlig, et al., 1992), mostrando efeito estimulatório, em doses baixas e moderadas (Svenningsson, et al., 1995a, b) e, depressor, em doses elevadas (Stoner, et al., 1988; El Yacoubi, et al. 2000, Mumford & Holtzman, 1991). O efeito estimulante é mediado pelo bloqueio de receptores A2a enquanto o efeito depressor é causado pelo bloqueio de A1 (El Yacoubi, et al. 2000).

A cafeína exerce seu efeito de forma dose-dependente. Muitos trabalhos mostram efeitos benéficos sobre a memória e o aprendizado com o uso de doses baixas entre 0,25 e 5mg/kg (Roussinov & Yonkov, 1976; Bernstein, et al., 1994; Cestari & Castellano, 1996), em contraposição a efeito amnésico promovido por doses moderadas ou altas, entre 15 e 80mg/kg (Izquierdo, et al., 1979; Molinengo, et al., 1995; Fisher & Guillet, 1997), as quais também se atribui efeito ansiogênico em camundongos submetidos à tarefa de labirinto em cruz elevado. Como elevadas doses de cafeína podem prejudicar a memória, provavelmente, essa ocorrência está relacionada a efeito ansiogênico (Lister, 1987; Baldwin, et al., 1989; Jain, et al., 1995; Bhattacharya, et al., 1997). O hipocampo, por sua vez, é importante para processos de aprendizado e memória e tem também participação na ansiedade (Gray, 1982; Kim & Fanselow, 1992; Phillips & LeDoux, 1992; LeDoux, 1995; Barkus et al., 2010; Oler et al., 2010; Sapolski et al., 1990; Xiang et al., 2011). Assim, a cafeína por antagonizar receptores A1 e A2a, presentes no hipocampo (ver revisão de Fredholm, et al., 1999), pode modular os processos de aprendizagem e memória (Scoville & Milner, 1957). Além disso, trabalhos (Smith, et al., 1997; Silva & Frussa-Filho, 2000; Silva, 2001; Gold, 1995) propõem a relação entre memória e ansiedade afirmando que baixos a moderados

níveis de ansiedade podem facilitar o aprendizado, enquanto altos níveis são capazes de prejudicá-lo.

Foi demonstrado que hormônios do estresse e ansiedade, por exemplo, corticotrofinas, glicocorticóides, vasopressina, epinefrina e norepinefrina estão envolvidos na regulação da formação de memórias (Izquierdo & Medina, 1997; Korneyev, 1997). Baixos a moderados níveis desses hormônios têm sido implicados na facilitação de memórias, enquanto há prejuízo com elevados níveis (Izquierdo, 1989; McGaugh, et al., 1995). Outra possibilidade é que o aparato não conseguiu exibir os níveis de ansiedade nos animais tratados com cafeína, já que a literatura mostra que as doses usadas são ansiogênicas (Izquierdo, et al., 1979; Molinengo, et al., 1995; Fisher & Guillet, 1997).

O estresse repetido assim como dose de cafeína de 30mg/kg podem induzir a um aumento da atividade do sistema dopaminérgico (Meyer & Caston, 2005). A cafeína age ao antagonizar receptores A2a desinibindo o sistema dopaminérgico, ao retirar a inibição do sistema gabaérgico sobre ele (Khisti, et al. 2000). Já os eventos estressores podem agir além da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Berridge & Dunn, 1989; Deroche, et al., 1995; Galina & Amit, 1985; Koch, et al., 1981; Radulovic, et al., 1999), ativando também o sistema dopaminérgico (Corda, et al., 1997; Doherty & Gratton, 1996; Imperato, et al., 1991; Inoue, et al., 1994). Meyer & Caston (2005) propõem, então, que o mecanismo responsável por efeitos comportamentais do estresse e de dose de cafeína de 30mg/kg sejam similares.

Sabe-se que efeitos psicoestimulantes da cafeína são conseguidos com baixas doses, enquanto efeitos depressores se dão em altas doses (Fredholm, et al. 1999; Roussinov & Yonkov, 1976; Bernstein, et al., 1994; Cestari & Castellano, 1996; Izquierdo, et al., 1979; Molinengo, et al., 1995; Fisher & Guillet, 1997). Tais efeitos comportamentais são demonstrados na locomoção, exploração ou reatividade (Fredholm, et al. 1999; Daly & Fredholm, 1998; Nehlig, et al. 1992; Nikodijevic, et al., 1993; Kaplan et al., 1993; Meyer & Caston, 2004). Doses baixas a moderadas suscitam alerta e vigilância, enquanto elevadas doses exacerbam ansiedade (Lister, 1987; Baldwin, et al., 1989; Jain, et al., 1995; Bhattacharya, et al., 1997). Em contrapartida, a cafeína melhora uma variedade de tarefas psicomotoras, por exemplo, aquelas que medem o tempo de reação e a acurácia de execução, mostram-se mais eficientes com doses mais elevadas de cafeína (Kenemans & Lorist, 1995; Lieberman, et al., 1987;

Lieberman et al., 2002; Wesensten et al., 2005); melhorando o alerta e a função executiva (Posner, 1990).

Uma série de dados sugere que baixas doses de cafeína possam atenuar a reposta do eixo HPA a estímulos estressores, caracterizando sua ação bifásica (Svenningsson, et al., 1995; Garrett & Holtzman, 1995). Doses baixas atenuam a elevação da liberação de serotonina e dopamina no hipocampo induzida por contenção (Yamato, et al., 2002), enquanto apenas o consumo de cafeína sem estímulo estressor eleva esses neurotransmissores no hipocampo (Carter, et al., 1995). Sugere-se também a existência de um mecanismo diferencial de ação antagônica sobre receptores A1 e A2a (El Yacoubi, et al., 2000; Uhde, et al., 1984a; Loke, et al., 1985; File, et al., 1988; Baldwin & File, 1989; McCloskey, et al., 1990; Nickell & Uhde, 1994; Jain, et al., 1995; Fredholm, et al., 1999). Tais ações centrais poderiam ser esperadas para regulação do núcleo paraventricular do hipotálamo. Patz, et al. (2006) demonstra que baixas doses de cafeína não atenuam o pico de resposta do eixo HPA a estímulo estressor sonoro. A ativação do eixo HPA mostra-se dependente diretamente do estímulo estressor ou da administração de cafeína, de forma dose-dependente, isto é, quanto maiores as intensidades do estímulo ou a dose de cafeína, maiores os níveis hormonais de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). Entretanto, a cafeína não modula o eixo, 30 minutos após estímulo estressor (barulho de 80 ou 105 dB por 30 minutos), pois os valores hormonais de ACTH não diferem do grupo controle (Patz, et al. 2006).

Nicholson (1989) verificou que elevadas doses de cafeína (30mg/kg), mas não baixas doses (10mg/kg) induzem elevações na corticosterona plasmática 2h após injeções. Em outro estudo, foi visto que a cafeína administrada em camundongos sujeitos ao paradigma de estresse imprevisível prolongado (seis dias), o qual utiliza vários estímulos como estressores (contenção, mergulho em água gelada, campo aberto), não foi capaz de reverter o efeito do estresse, além de não mostrar relação dose-dependente (Meyer & Caston, 2004). Noschang, et al. (2009) verificaram que a cafeína não foi capaz de reverter o estresse crônico por contenção de 40 dias em ratos.

Deve-se destacar ainda no efeito do estresse, que a regulação do eixo HPA está sujeita a variáveis que podem ocasionar resultados comportamentais bastante distintos, entre elas: a espécie animal, a natureza, duração e frequência do estímulo estressor e a possibilidade de fuga do agente estressor (Benedek & Szikszay, 1985; Calcagnetti & Holtzman, 1990; Britton, et al., 1992; Hauger et al., 1988; Keller-Wood & Dallman,

1984; Rivier & Vale, 1987; Kovacs & Sawchenko, 1996; Patz, et al. 2006). Isso indica que em nossos experimentos, o estresse da injeção pode ter sido regulado pela ação da cafeína, já que não se observou o mesmo comportamento no grupo controle, quanto ao aspecto temporal da memória tipo-episódica.

A via colinérgica tem um papel crucial no controle da excitação, motivação e atenção cognitiva, ramifica-se extensivamente no hipocampo, amígdala, septo, córtex frontal e outras regiões límbicas, onde reciprocamente interage com vias monoaminérgicas, gabaérgicas e glutamatérgicas e modula o eixo hipotálamo-corticotrófico (Wonnacott, 1997; Bugajski, et al., 1998; Picciotto, 1999; Paterson & Nordberg, 2000; Li, et al. 2001b; Araki, et al. 2002; Hajszan & Zabroszky, 2002; Seth, et al. 2002; Gobert, et al. 2003). A atividade das vias colinérgicas frontocorticais, hipocampais e septal lateral é reforçada em resposta a estímulos estressores e ansiogênicos. A superativação de entradas colinérgicas para o córtex frontal pode contribuir para estados ansiosos enquanto mecanismos colinérgicos septais participam da resposta ao estresse (Miczek & Lau, 1975; Gilad, 1987; Acguas, et al., 1996; Berntson et al., 1998; Ceccarelli et al., 1999; Hart et al., 1999; Sarter & Bruno, 1999; Giovannini et al., 2001; Ichikawa et al., 2002; Kubo et al., 2003). Sob condições de estresse, o papel ansiogênico da acetilcolina pode envolver a geração de uma isoforma de acetilcolinesterase, aumentando sua concentração na amígdala, hipocampo e córtex, sendo implicada na indução de estados ansiosos (Weeber, et al., 2000; Birikh, et al., 2003). Os mecanismos muscarínicos para contenção de ansiedade via ações no hipocampo, possivelmente, refletem a modulação da transmissão gabaérgica (Rodgers & Cole, 1995; File, et al. 1998, 2000; Smyth, et al. 1998; Wu, et al. 2000).

Sítios A1 são ricos no hipocampo, septo e córtex (Rivkees, et al., 1995; Swanson, et al. 1995; Dixon et al., 1996; Ralevic & Burnstock, 1998; Ochiishi, et al. 1999). Eles medeiam a influência inibitória da adenosina sob as vias glutamatérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas corticolímbicas (Impagnatiello, et al., 2000; Johansson, et al., 2001; Nikbakht & Stone, 2001; Okada, et al., 2001; Abrams, et al., 2002; Masino, et al., 2002; Solinas, et al., 2002). Estudos empregando modelos baseados no comportamento exploratório indicam que a estimulação seletiva e o antagonismo de receptores A1 são associados, respectivamente, com ações ansiolíticas e ansiogênicas (Baldwin & File, 1989; Jain, et al., 1995; Florio, et al., 1998). Receptores A2a estão concentrados no gânglio basal e núcleo acúmbens, mas também são

detectados no lócus cerúleo, núcleo dorsal da rafe, hipocampo, córtex e amígdala (Olah & Stiles, 1995; Dixon, et al., 1996; Rosin, et al., 1998; Impagnatiello, et al., 2000; Fredholm, et al., 2001; Phillis, 2001; DeMet & Chicz-DeMet, 2002). Além disso, parecem ter localização compartilhada com sítios A1 em neurônios glutamatérgicos, serotoninérgicos e gabaérgicos (Impagnatiello, et al., 2000; Nikbakht & Stone, 2001). Há evidências que receptores A2 exercem influência facilitatória sobre a liberação de GABA no septo e hipocampo, ao mesmo tempo, são excitatórios para neurônios serotoninérgicos e glutamatérgicos no hipocampo (Popoli et al., 1995; Impagnatiello et al., 2000; Okada et al., 2001). Portanto, não se tem nenhuma conclusão sobre seu efeito na ansiedade (Baldwin & File, 1989; Griebel, et al., 1991; Jain, et al., 1995; Ledent, et al., 1997).

Apesar de receptores A2a serem mais prevalentes no estriado, sua relativa escassez no hipocampo não implica em um papel minoritário no processamento cognitivo nessa região. Rebola e colaboradores (2008) mostraram que a potenciação de longo-prazo¹ de correntes sinápticas mediadas por NMDA entre fibras musgosas e células piramidais CA3 depende de receptores de adenosina A2a pós-sinápticos. Ações psicoestimulantes da cafeína são atribuídas ao bloqueio de receptores A1 e A2a, entretanto, dados recentes mostram que os efeitos excitatórios bem como neuroprotetores parecem ser devido ao bloqueio preferencial de receptores A2a (Dall'Igna et al., 2003; Higgins, et al., 2007; Huang, et al., 2005; Silva, et al., 2007). Nesse sentido, a prevenção de declínio cognitivo e melhora de desempenho promovidas pela cafeína, em animais, é reproduzida por antagonistas A2a, mas não antagonistas A1 (Dall'Igna et al., 2007; Higgins, et al., 2007; Kopf, et al., 1999; Prediger, et al., 2005a,b).

Tem sido sugerido que o consumo crônico de moderadas doses de cafeína não causa consistentes efeitos mnemônicos em humanos ou animais saudáveis, mas melhoram o desempenho em sujeitos idosos (Vila-Luna, et al., 2012) ou com comprometimento da memória (Dall'Igna, et al., 2007; Johnson-Kozlow, et al., 2002; Prediger, et al., 2005; Ritchie, et al., 2007; Riedel, et al. 1995; Riedel & Jolles, 1996). A cafeína é capaz de prevenir o déficit ocasionado pelas lesões β -amilóides, corroborando para a proposta de neuroproteção do Mal de Alzheimer (de Maia & de Mendonça, 2002). Em nosso estudo, vimos que a cafeína na dose de 30mg/kg foi capaz de exercer efeito mnemônico positivo, na tarefa de ordem temporal, em condição de

maior dificuldade de execução. Isso sugere a cafeína pôde agir em condição de redução do desempenho, nesse caso, provavelmente provocada pelo estresse de injeção, já que o grupo controle não discriminou os objetos.

Outros mecanismos têm sido propostos para ação neuroprotetora: a cafeína agiria alterando a morfologia sináptica, ao aumentar o número e o tamanho de espículas dendríticas como verificado em culturas de neurônios hipocampais (Korkotian & Segal, 1999), ou ainda, levaria ao crescimento da atividade de enzimas antioxidantes, com consequente reforço cognitivo (Noschang, et al., 2009; Abreu, et al., 2011). Em condições de declínio cognitivo decorrente da idade houve melhora cognitiva de curto-prazo, em tarefa de reconhecimento de objetos, com o tratamento prolongado de cafeína desde a idade adulta até a senil. Animais idosos tratados com cafeína chegaram a apresentar padrões comportamentais similares aos controles adultos, enquanto animais idosos não tratados apresentaram déficit cognitivo (Costa, et al. 2008a). Tal estudo considera que não se pode excluir de seus resultados o efeito agudo da cafeína. Outro estudo envolvendo o tratamento de animais jovens e saudáveis com cafeína por 6 meses, submetidos a tarefas em labirinto em cruz, campo aberto e labirinto em Y, comparados a animais de mesma idade sem tratamento, tiveram melhor desempenho e aumento no número e comprimento de dendritos basais da região CA1, mesmo com os testes sendo realizados após descontinuação do tratamento (14-28 dias após), o que indica plasticidade. Já nas regiões CA3 e giro denteado não foram encontradas diferenças entre os grupos (Vila-Luna, et al., 2012).

É possível que mecanismos tróficos subsidiem a alteração da morfologia dendrítica em animais tratados com cafeína. A liberação de fatores tróficos no hipocampo é diretamente proporcional à taxa de disparo neuronal, com a máxima liberação ocorrendo em frequências que induzem potenciação de longo-prazo¹ (Balkowiec & Katz, 2002). Baixas concentrações de cafeína induzem o disparo no hipocampo (Pietersen, et al., 2009) e facilitam a LTP (Costenla, et al., 2010; Simons, et al., no prelo).

O estudo de Costa, et al. (2008a) propõe que a dose e o esquema prolongado de administração não alteraram os níveis de ansiedade, pois os animais não evitaram a exploração dos objetos. Enfatizando que a cafeína em altas doses ou outros esquemas de administração podem suscitar a ansiedade (El Yacoubi, et al., 2000; Jain, et al., 2005) e causar prejuízos cognitivos em tarefas de aprendizado e memória (Silva e Frussa-Filho,

2000). Também em tarefa de reconhecimento de objetos, pré-tratamento com cafeína preveniu o prejuízo da memória de curto e longo-prazos pela escopolamina, corroborando propriedades de reforço cognitivo do sistema colinérgico pela cafeína (Botton, et al. 2010). Estudo anterior realizado em nosso laboratório também evidenciou a prevenção parcial da cafeína em condição de déficit colinérgico promovido pela escopolamina, em tarefa aversiva, comparativamente ao grupo tratado apenas com cafeína (dados não-publicados).

Os resultados obtidos com o tratamento agudo de cafeína diferem daqueles vistos no tratamento crônico, indicando que a discriminação de objetos ocorreu somente nesse último. Isso sugere que o efeito positivo deveu-se não à ação aguda da droga, mas sim a um mecanismo de plasticidade decorrente de um tratamento prolongado. Entretanto, a sobrevivência de novos neurônios nascidos sob influência desse tratamento e de tarefas hipocampo-dependentes não explica o efeito comportamental, haja vista que não houve diferença entre os grupos no número de células BrdU/NeuN (Figuras 5 e 6; gráfico 26; tabela 1). Outros mecanismos de neuroplasticidade devem explicar o efeito comportamental.

De acordo com Kart-Teke, et al. (2006), é possível que a memória episódica em humanos e tipo-episódica em animais seja influenciada pela plasticidade de receptores NMDA nos córtices perirrinal, pré-frontal e no hipocampo. Outros trabalhos apóiam a relação de receptores NMDA e memória tipo-episódica (De Lima et al., 2005; Mandillo et al., 2003; Long & Kesner, 1995). O antagonismo de receptores A1 induz o reforço potente de respostas de fibras musgosas *in vitro* (Moore et al., 2003) e *in vivo* (Klausnitzer & Manahan Vaughan, 2008; Hagen & Manahan Vaughan, 2010), por meio da redução de inibição tônica promovida pela adenosina presente. Esse efeito é proeminente em fibras musgosas e contribui parcialmente para propriedades eletrofisiológicas de transmissão sináptica, tais como, a facilitação de alta frequência e pulso-pareada (Nicoll e Schmitz, 2005). Cafeína induz, ainda, oscilações de disparos espontâneos no hipocampo (Pietersen, et al., 2009), além de ter sido averiguado que o tratamento crônico promove mudanças morfológicas em neurônios piramidais de vertebrados (Burgess & Monachello, 1983; Juárez-Méndez et al., 2006).

Wentz & Magavi (2009) avaliaram que o tratamento por sete dias com doses moderadas a altas de cafeína (20-30mg/kg/dia) reduziram a proliferação neuronal hipocampal (giro denteado) em camundongos adultos, enquanto doses suprafisiológicas

(60mg/kg/dia) aumentaram a proliferação. No entanto, a sobrevivência desses neurônios desenvolvidos em resposta a doses suprafisiológicas, quando comparados aos controles, não foi sustentada depois de quatro ou oito semanas. Também não houve diferenciação sináptica, traduzida como aumento ou alteração do comprimento de dendritos, em decorrência do tratamento. A administração aguda de doses moderadas a suprafisiológicas ou, crônica de baixas doses não exerceriam efeito sobre a proliferação; doses moderadas podem até reduzi-la. Entretanto, no estudo de Wentz & Magavi (2009) não foram realizados experimentos que avaliassem o efeito comportamental da cafeína sobre o aprendizado e memória. Como os neurônios não foram utilizados em tarefas comportamentais (Clelland, et al. 2009), é possível que tenham sido retirados da rede (Alme, et al., 2010; Deng, et al., 2010; Aimone, et al., 2010).

Considerando o efeito positivo da cafeína nos processos de aprendizado e memória em vários estudos (Angelucci, et al., 1999; Cestari & Castellano, 1996; Yonkov & Roussinov, 1983; Gevaerd, et al., 2001; Yonkov, 1984; Molinengo, et al., 1995; Costa, et al. 2008b; Angelucci, et al. 2002) e a importância da neurogênese para aprendizado de tarefas hipocampo-dependentes (Shors, et al., 2001; Kempermann, et al., 1997; Imayoshi, et al. 2008; Clelland, et al. 2009; Snyder, et al. 2009a,b,c; Ramirez-Amaya, et al. 2006), a cafeína poderia agir como reforçador cognitivo e influenciar o processo de neurogênese e sobrevivência neuronal decorrente de aprendizado, por meio do antagonismo de receptores adenosinérgicos (ver revisão de Zimmermann, 2006). O receptor do tipo adenosina pode estar envolvido no mecanismo pelo qual a cafeína afeta a neurogênese, já que é regulado pelo fármaco (Cauli & Morelli, 2005), ao mesmo tempo, a ativação do receptor de adenosina A2a é antagonista ao receptor de dopamina D2, que tem sido visto exercendo papel de reforço na neurogênese (Ohtani, et al., 2003). Entretanto nosso estudo também não mostrou diferenças entre grupos tratados e não tratados com cafeína, quanto à sobrevivência neuronal, visto que o número de novos neurônios gerados (células BrdU e NeuN positivas; figuras 5 e 6; gráfico 26) não diferiu significativamente entre os grupos.

Outro estudo avaliando a proliferação e a sobrevivência de novos neurônios no giro denteado mostrou que um tratamento com baixa dose (3g/l) de cafeína reduz ambos os processos, comparado a grupo controle. Nesse estudo verificou-se também a influência do aprendizado de tarefa espacial hipocampo-dependente, sendo que o grupo

caféina apresentou piora no desempenho e prejuízo de memória de longo-prazo (Han, et al. 2007).

O estudo de Kochman e colaboradores (2009) apoia os achados de redução na proliferação decorrente do tratamento com caféina (20mg/kg), nesse caso, a redução se deu na região do hilo, mas não na zona subgranular e a caféina foi administrada três vezes, a cada quatro horas, durante a fase clara (sono). Não foi encontrada redução na proliferação, em nenhuma das regiões, quando o experimento foi realizado na fase escura (ativa), indicando que os resultados de redução na neurogênese, devido ao consumo de caféina, ocorreram por seu efeito estimulante com consequente supressão do sono.

No nosso estudo, os resultados referentes à neurogênese não mostraram modificações decorrentes do tratamento crônico com caféina. Assim, apesar de nossa hipótese inicial de que a caféina poderia promover excitação nos neurônios recém-gerados e auxiliar a sua sobrevivência e integração no circuito pré-existente não ter sido confirmada, também não houve redução da sobrevivência em contraposição a estudos anteriores (Han, et al. 2007; Wentz & Magavi, 2009).

Além disso, outras modificações podem mediar o efeito mnemônico positivo da caféina, como alterações eletrofisiológicas, morfológicas ou metabólicas. O uso prolongado de caféina mostrou-se capaz de prevenir déficit cognitivo associado à idade avançada por modificações plásticas em neurônios hipocâmpais CA1, havendo aumento no comprimento, ramificação e densidade de dendritos (Vila-Luna, et al., 2012). A caféina também foi capaz de inibir correntes de GABA em fatias hipocâmpais (Taketo, et al., 2004). Propiciou a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, reforçando a reatividade mediada por receptores NMDA (Segal, 1992). A exposição crônica à droga induziu oscilações de alta-frequência em CA3 mediadas pela entrada de cálcio extracelular, contribuindo para a transmissão sináptica (Shui-Jin, et al., 2004). A caféina exerce ainda efeitos sobre fatores neurotróficos. A proteína CREB (ligadora de elementos responsivos a Ca^{2+} /AMPC) é um fator transcricional crítico para o desenvolvimento e função do sistema nervoso central (Lonze & Ginty, 2002). CREB medeia, por exemplo, a transcrição de BDNF que promove sobrevivência neuronal, crescimento neurítico e plasticidade sináptica (Cunha, et al., 2010). Nesse sentido, CREB mostrou papel fundamental no crescimento dendrítico de novos neurônios no giro denteado (Jagasia, et al., 2009). Connolly & Kingsbury (2010) verificaram que a

caféina aumentou a concentração de BDNF em culturas de neurônios corticais em desenvolvimento, modulando a expressão genética dependente de CREB. A caféina estimulou a atividade de PKA (proteína quinase A) reduzindo a expressão de fosfo-JNK e fosfo-ERK no córtex frontal de camundongos, o que significa que houve inibição de cascatas pró-apoptóticas, contribuindo, assim, para neuroproteção (Zeitlin, et al., 2011).

Os resultados das tarefas utilizadas em nosso estudo são sutis e podem ser influenciados por fatores como motivação para exploração (Kart-Teke, et al., 2006) e espécie ou linhagem utilizada (Dere, et al., 2005a; Hunsaker & Kesner, 2008). O estudo de Hunsaker & Kesner (2008) utilizou ratos machos Long-Evans que apresentam maior comportamento exploratório que ratos Wistar. Além disso, sabe-se que a discriminação espacial entre dois objetos iguais, um em uma nova posição e outro em posição familiar é mais difícil que a discriminação de novidade do objeto ou recência temporal (Dere, et al., 2003; Ennaceur, et al., 1997; Frisch, et al., 2005; Mumby, et al., 2002). A discriminação espacial frequentemente ocorre no primeiro minuto para ratos (Barbosa, et al., 2010; Dere, et al., 2005a,b; Dix & Aggleton, 1999). Entretanto, em nossas análises não verificamos diferenças estatísticas significativas para os parâmetros avaliados no primeiro minuto das sessões, entre os grupos.

Nossos experimentos mostraram que a caféina administrada cronicamente pôde melhorar o desempenho de ratos Wistar em tarefas de memória tipo-episódica, em detrimento do uso agudo, indicando que possivelmente mecanismos plásticos estejam mediando a melhora na memória. No nosso tratamento agudo pudemos notar até um prejuízo, em alguns casos, decorrente do uso da caféina, ao compararmos os grupos tratados com o controle. Como o aspecto melhorado nas tarefas devido uso crônico de caféina foi o temporal, enquanto que o aspecto espacial pareceu ser discriminado apenas nos grupos controle, tanto crônico, quanto agudo, é possível que a região CA1 esteja mediando o seu efeito positivo, em vez do giro denteado ou CA3. Já que a região CA1 tem sido implicada com relações temporais da memória tipo-episódica, enquanto o giro denteado e CA3 estão envolvidos em processamento espacial.

7. Considerações finais e conclusões

Nosso estudo revelou que a administração crônica de cafeína na dose de 15mg/kg exerceu ação benéfica sobre o aspecto temporal da memória tipo-episódica em ratos Wistar adultos, possivelmente revertendo o déficit cognitivo decorrente de estímulo estressor. Vimos ainda que a dose de 30mg/kg de cafeína aplicada cronicamente também exerceu efeito positivo na ordem temporal para discriminação espacial, em condição de maior dificuldade de execução, mas não em condição de menor dificuldade. Isso sugere que altas doses de cafeína propiciaram melhor desempenho em condições de maior dificuldade de discriminação de padrões. Não verificamos efeito positivo na memória tipo-episódica em nenhuma das tarefas, com nenhuma dose aplicada agudamente, mostrando que o tratamento crônico é efetivo em contraposição ao tratamento agudo. Apesar dos resultados para dose crônica elevada poderem sugerir alteração estrutural no giro denteado, não verificamos que tal plasticidade seja decorrente de influência da droga e/ou aprendizado sobre a sobrevivência neuronal. Assim, outros mecanismos plásticos devem subsidiar o efeito comportamental visto nesse estudo. Uma possibilidade que pode ser averiguada futuramente é que alterações plásticas, sejam eletrofisiológicas ou morfológicas, podem ter ocorrido em outras regiões hipocampais, por exemplo, em CA1 que é relacionada com aspectos temporais da memória tipo-episódica. Haja vista que nas duas tarefas utilizadas verificamos melhora do aspecto temporal (mesmo na tarefa de ordem temporal para localizações espaciais que envolveu discriminação de padrões, pois a relação espaço-temporal nessa tarefa não pode ser separada).

Nosso trabalho contribuiu no sentido de verificar a melhora no desempenho de ratos submetidos a tratamento crônico com cafeína. A elevação de acetilcolina, que pode ser consequência do uso de cafeína está implicada, no hipocampo, na codificação de novo estímulo (por exemplo, novos objetos) e modulação da consolidação de memória. O hipocampo tem sido associado com reconhecimentos de objeto-lugar, mas não reconhecimento de objetos *per se*, além de também ter sido implicado em distinções espaço-temporais (Kesner, et al., 2004; Hunsaker & Kesner, 2008), contribuindo para memória tipo-episódica. Doença neurodegenerativa envolvendo a perda de memória tipo-episódica, como a Doença de Alzheimer tem sido revertida em estudos com

modelos animais tratados cronicamente com cafeína. Utilizamos um protocolo à base de tarefas hipocampo-dependente para avaliar o processo de neurogênese e a possível influência de um agente farmacológico que reforçasse a cognição. Apesar de nossos resultados não averiguarem a relação entre aprendizado, cafeína e sobrevivência neuronal, abre a possibilidade de outros mecanismos plásticos estarem envolvidos na melhora cognitiva. O trabalho tentou entender o papel da maturação e de fatores moduladores sobre o desenvolvimento de novos neurônios, sendo que a sobrevivência das novas células geradas sugere uma função de longo-prazo, embora não influenciada pela cafeína. Nosso estudo corrobora estudos anteriores que verificaram o papel positivo do uso prolongado da cafeína na memória, ainda que não tenha identificado o mecanismo plástico responsável pela melhora.

Referências Bibliográficas

- ABRAMS, J.K., et al. Different anxiogenic drugs activate a common, topographically distinct subpopulation of serotonergic neurones in the rat dorsal raphe nucleus. *Soc. Neurosci. Abstr.* P.1-75, 2002.
- ABREU, R.V., et al. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.99, p.659–664, 2011.
- ACQUAS, E., et al. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation and fear. *J. Neurosci.* V.16, p.3089–3096, 1996.
- AGGLETON, J. P., & BROWN, M. W. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behavioral Brain Sciences*, v.22, p.425–444, 1999.
- AGGLETON, J.P. & BROWN, M.W. Interleaving brain systems for episodic and recognition memory. *Trends in Cognitive Sciences*, v.10, n.10, p.455–463, 2006.
- AIMONE, J.B. & GAGE, F.H. Modeling new neuron function: A history of using computational neuroscience to study adult neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* V.33, p.1160–1169, 2011.
- AIMONE, J.B., et al. Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends Cogn Sci.* v.14, n.7, p.325– 337, 2010.
- AIMONE, J.B., et al. Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron*, v.61, p.187–202, 2009.
- AIMONE, J.B., et al. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature Neuroscience*, v.9, p.723–727, 2006.
- AIMONE, J.B., et al. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*, v.70, p.589–596, 2011.
- ALME, C.B., et al. Hippocampal granule cells opt for early retirement. *Hippocampus*, v.20, p.1109–1123, 2010.
- ALVAREZ-BUYLLA, A. & NOTTEBOHM, F. Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature.* V.335, p. 353-354, 1988.
- AMBROGINI, P. Et al. Synaptogenesis in adult-generated hippocampal granule cells is affected by behavioural experiences. *Hippocampus*, 2009.
- ANGELUCCI, M.E.M., et al. The effect of caffeine on animal models of learning and memory. *European Journal of Pharmacology.* V.373, p.135-140, 1999.
- ANGELUCCI, M.E.M., et al. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. *Brazilian Journal of medical and biological Research*, v. 35, p. 1201-1208, 2002.
- ARAI, A, et al. The effects of adenosine on development long-term potentiation. *Neuroscience Letters.* V.119, p.41-44, 1990.
- Araki, H., et al. Neuronal nicotinic receptor and psychiatric disorders: functional and behavioral effects of nicotine. *Jpn. J. Pharmacol.* V.88, p.133–138, 2002.
- ARENDASH, G. W., et al. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β -amyloid production. *Neuroscience.* V.142, p. 941–952, 2006.
- BABB, S.J., CRYSTAL, J.D. Discrimination of what, when, and where: implications for episodic-like memory in rats. *Learning & Motivation*, v. 36, p.177–189, 2005.

- BABB, S.J., CRYSTAL, J.D. Discrimination of what, when, and where is not based on time of day. *Learning & Behavior*, v. 34, p.124–130, 2006a.
- BABB, S.J., CRYSTAL, J.D. Episodic-like memory in the rat. *Current Biology*, v.16, p.1317–1321, 2006b.
- BAKER, K. B., & KIM, J. J. Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learning and Memory*, v.9, p.58–65, 2002.
- BALDWIN, H.A. & FILE, S.E. Caffeine-induced anxiogenesis: the role of adenosine, benzodiazepine and noradrenergic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* V.32, p.181–186, 1989.
- BALDWIN, H.A., et al. Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. *Eur J Pharmacol*, v.159, p.211–215, 1989.
- BALDWIN, H.A., et al. Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. *Eur J Pharmacol.* V.159, p.211–215, 1989.
- BALKOWIEC, A. & KATZ, D.M. Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci.* V.22, p.10399–10407, 2002.
- BARBOSA, F.F, ET AL. Differential role of hippocampal regions for “what”, “where” and “when” memory in rats. No prelo.
- BARBOSA, F.F, ET AL. Extending possible applications of na episodic-like memory task in rats. *Behavioural Brain Research.* V. 215, p.326–331, 2010.
- BARKUS, C., et al. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol.* V.626, p.49–56, 2010.
- BAXTER, M. G., et al. D-Cycloserin, a novel cognitive enhancer, improves spatial memory in aged rats. *Neurobiology of Aging*, v.15, p. 207–213, 1994.
- BECKER, S. & WOJTOWICZ, J.M. A model of hippocampal neurogenesis in memory and mood disorders. *TICS*, v.11, p.70–76, 2007.
- BECKER, S. A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. *Hippocampus*, v.15, p.722–738, 2005.
- BEN-ARI, Y. & SPITZER, N.C. Nature and nurture in brain development. *Trends Neuroscience*, V.27, n.7, p. 361, 2004.
- BENEDEK, G. & SZIKSZAY, M. Sensitization or tolerance to morphine effects after repeated stresses, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v.9, p.369–380, 1985.
- BERNSTEIN, G.A., et al. Caffeine dependence in teenagers. *Drug & Alcohol Dependence*, v. 66, p.1–6, 2002.
- BERNSTEIN, G.A., et al. Caffeine effects on learning, performance, and anxiety in normal school-age children. *Journal of The American Academy of Child And Adolescent Psychiatry.* V.33, p.407–15, 1994.
- BERNTSON, G.G., et al. Anxiety and cardiovascular reactivity: the basal forebrain cholinergic link. *Behav. Brain Res.* V.94, p.225–248, 1998.
- BERRIDGE, C.W. & DUNN, A.J. Restraint-stress-induced changes in exploratory behavior appear to be mediated by norepinephrine stimulated release of CRF, *J. Neurosci.* V.9, p.3513– 3521, 1989.
- BERRIDGE, M.J. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* V. 21, p.13-26, 1998.
- BERTAINA-ANGLADE, V., et al. Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *Eur J Neurosci.* V.12, p.3803–4381, 2000.

- BERTAINA-ANGLADE, V. ET AL. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. V.54, p.99–105, 2006.
- BHATTACHARYA, et al. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *Journal of Psychopharmacology*. V.11, n.3, p.219-24, 1997.
- BIRD, L. R., et al. Spatial memory for food hidden by rats (*Rattus norvegicus*) on the radial maze: Studies of memory for where, what, and when. *Journal of Comparative Psychology*, v.117, p.176–187, 2003.
- BIRIKH, K.R., et al. Interaction of “readthrough” acetylcholinesterase with RACK1 and PKC - II correlates with intensified fear-induced conflict behavior. *Proc. Natl. Am. Soc. U.S.A.* v.100, p.283–288, 2003.
- BISCHOFBERGER, N., et al. Adenosine A1 receptor agonists as clinically viable agents for treatment of ischemic brain disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* V.825, p.23–29, 1997.
- BLISS, T.V. & COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. V. 361, p. 31-39, 1993.
- BONCI, A. & WILLIAMS, J.T. A common mechanism mediates long-term changes in synaptic transmission after chronic cocaine and morphine. *Neuron*, v.16, p.631–639, 1996.
- BOTTON, P.H. ET AL. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behavioural Brain Research*. V.214, p.254-259, 2010.
- BOURIN, M., et al. Neurobiology of panic disorder. *Journal of Psychosomatic Research*. V.44, p.163–80, 1998.
- BOWYER, P., HUMPHREYS, M. & REVELLE, W. Arousal and recognition memory: the effects of impulsivity, caffeine and time on a task. *Personality & Individual Differences*. V.4, p.41–45, 1983.
- BRANCO, T. & HAUSSER, M. The single dendritic branch as a fundamental functional unit in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* V.20, p.494-502, 2010.
- BRAND, A., et al. Adenosine A(1) and A(3) receptors mediate inhibition of synaptic transmission in rat cortical neurons. *Neuropharmacology*, v.40, p.85–95, 2001.
- BRITTON, K.T., et al. Dissociation between in vivo hippocampal norepinephrine response and behavioral/neuroendocrine responses to noise stress in rats. *Brain Research*, v.574, p.125–130, 1992.
- BROWN, M.W. & AGGLETON, J.P. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Reviews Neuroscience*, v.2, n.1, p.51–61, 2001.
- BUFFALO, E.A., et al. Dissociation between the effects of damage to perirhinal cortex and area TE. *Learning and Memory*, v. 6, p.572–599, 1999.
- BUGAJSKI, J., et al. Involvement of the central noradrenergic system in cholinergic stimulation of the pituitary–adrenal response. *J. Physiol. Pharmacol.* V.49, p.285–292, 1998.
- BUONOMANO, D.V. & MERZENICH, M.M. Cortical plasticity: From Synapse to maps. *Annual Review of Neuroscience*. V.21, p.149-186, 1998.
- BURGESS, J.W. & MONACHELLO, M.P. Chronic exposure to caffeine during early development increases dendritic spine and branch Formation in midbrain optic tectum. *Brain Res.* V.282, p.123–129, 1983.

- BURGESS, N., et al. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, v.35, n.4, p.625–641, 2002.
- BURKE, S.P. & NADLER, J.V. Regulation of glutamate and aspartate release from slices of the hippocampal CA1 area: effects of adenosine and baclofen. *J. Neurochem.* V.51, p.1541–1551, 1988.
- BUZSÁKI, G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, v.33, p.325-340, 2002.
- CALCAGNETTI, D.J. & HOLTZMAN, S.G. Factors affecting restraint stress-induced potentiation of morphine analgesia, *Brain Res.* V.537, p.157–162, 1990.
- CARTER, A.J., et al. Caffeine enhances acetylcholine release in the hippocampus in vivo by a selective interaction with adenosine A1 receptors. *Journal of Experimental Therapeutics*, v.273, p.637–642, 1995.
- CASAS, M., et al. Relationship between rotational behaviour induced by apomorphine and caffeine in rats with unilateral lesion of the nigrostriatal pathway. *Neuropharmacology.* V. 28, p.407–409, 1989.
- CASAS, M., et al. Scopolamine prevents tolerance to the effects of caffeine on rotational behavior in 6-hydroxydopamine-denervated rats. *European Journal of Pharmacology.* V. 366, p.1–11, 1999.
- CAULI, O. & MORELLI, M. Caffeine and the dopaminergic system, *Behav.Pharmacol.* V.16, p. 63–77, 2005.
- CECCARELLI, I., et al. Effects of novelty and pain on behavior and hippocampal extracellular ach levels in male and female rats. *Brain Res.* V. 815, p. 169–176, 1999.
- CESTARI, V. & CASTELLANO, C. Caffeine and cocaine interaction on memory consolidation in mice. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie.* V.331, p 94-104, 1996.
- CHAMBERLIN, N.L., et al. Effects of adenosine on gabaergic synaptic inputs to identified ventrolateral preoptic neurons. *Neuroscience*, v.119, p.913–918, 2003.
- CHIBA, A. A., et al. Memory for spatial location as a function of temporal lag in rats: Role of hippocampus and medial prefrontal cortex. *Behavioral and Neural Biology*, v.61, p.123–131, 1994.
- CHOU, D. T., et al. Caffeine tolerance: behavioral, electrophysiological and neurochemical evidence. *Life Sciences.* V.36, p.2347-2356, 1985.
- CLAIBORNE, B.J. et al. Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* V.302, p.206-219, 1990.
- CLAYTON, N.S. & DICKINSON, A., Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*, v. 395, p.272–274, 1998.
- CLELLAND, C. D. ET AL. A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science.* V.325, p.210, 2009.
- COLLINGRIDGE, G.L. & BLISS, T.V. Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci.* V.18, p.54–56, 1995.
- CONNICK, J.H. & STONE, T.W. Quinolinic acid neurotoxicity: protection by intracerebral phenylisopropyladenosine (PIA) and potentiation by hypotension. *Neurosci. Lett.* V.101, p.191–196, 1989.
- CONNOLLY, S. & KINGSBURY, T.J. Caffeine modulates CREB-dependent gene expression in developing cortical neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.397, p.152–156, 2010.
- CORDA, M.G., et al. Biochemical parameters of dopaminergic and gabaergic neurotransmission in the CNS of Roman high-avoidance and Roman low-avoidance rats, *Behav. Genet.* V.27, p. 527–536, 1997.

- CORRADETTI, R. Chronic caffeine treatment reduces caffeine but not adenosine effects on cortical acetylcholine release. *Brain Journal of Pharmacology*. V.88, p.671-676, 1986.
- COSTA, M. S., ET AL. Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task increases BDNF and trkb independent on phospho-CREB immunocontent in the hippocampus. *Neurochemistry International*. V.53, p.89-94, 2008b.
- COSTA, M. S., ET AL. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tirosine kinase receptor (trkb) content in mice. *Neuroscience*. V.153, p.1071–1078, 2008a.
- COSTENLA, A.R., et al. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. *J Alzheimers Dis*. V. 20 (Suppl1), S25–S34, 2010.
- CUNHA, C., et al. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol. Neurosci*. V.3, p.1–14, 2010.
- CUNHA, R.A. Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volumetransmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity. *Neurochemistry International*. V.52, p.65-72, 2008.
- CUNHA, R.A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signalling*, v.1, p. 111–134, 2005.
- D'ALCANTARA, P. et al. Inactivation of adenosine A2A receptor impairs long term potentiation in the accumbens nucleus without altering basal synaptic transmission. *Neuroscience*. V.107, p.455-464, 2001.
- DALLIGNA, O. P., et al. Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent β -amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. *Experimental Neurology*. V. 203, p. 241–245, 2007.
- DALLIGNA, O. P., et al. Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of β -amyloid neurotoxicity. *Brain Journal of Pharmacology*. V.138, p.1207–1209, 2003.
- DALPIAZ, A. & MANFREDINI, S. Adenosine A(1) receptor: analysis of the potential therapeutic effects obtained by its activation in the central nervous system. *Curr. Med. Chem*. V.9, p.1923–1937, 2002.
- DALY, J. W. & FREDHOLM, B.B. Caffeine: an atypical drug of dependence. *Drug & Alcohol Dependence*. V.51, p.199–206, 1998.
- DALY, J. W. Review Caffeine analogs: biomedical impact. *Cellular and Molecular Life Sciences*. V.64, p.2153 – 2169, 2007.
- DALY, J. W. Review Caffeine analogs: biomedical impact. *Cellular and Molecular Life Sciences*. V.64, p.2153 – 2169, 2007.
- DE LIMA, M. N., et al. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research*, v.156, p.139–143, 2005.
- DE MENDOÇA, A. DE & RIBEIRO, J. A. Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience*. V.62, p.385-390, 1994.
- DE MENDOÇA, A. DE & RIBEIRO, J. A. 2-Chloroadenosine decreases long-term potentiation in the hippocampal CA1 area of the rat. *Neuroscience Letters*. V. 118, p.107-111, 1990.
- DE MENDONÇA, A. & RIBEIRO, J.A. Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci*. V.60, p.245–251, 1997.

- DE MENDONCA, A. & RIBEIRO, J.A. Endogenous adenosine modulates longterm potentiation in the hippocampus. *Neuroscience*, v. 62, p.385–390, 1994.
- DE MENDONCA, A. & RIBEIRO, J.A. Long-term potentiation observed upon blockade of adenosine A1 receptors in rat hippocampus is N-methyl-D-aspartate receptor-dependent. *Neurosci. Lett.* V.291, p.81–84, 2000.
- DE MENDONCA, A., et al. Endogenous adenosine attenuates long-term depression and depotentiation in the CA1 region of the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, v.36, p.161–167, 1997.
- DE MENDONCA, A., RIBEIRO, J.A. Endogenous adenosine modulates longterm potentiation in the hippocampus. *Neuroscience*, v. 62, p.385–390, 1994. *Dementia Section*, v.9, p.133–144, 1995.
- DEMET, E.M. & CHICZ-DEMET, A. Localization of adenosine A2 receptors in rat brain with [3H]ZM-241385. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* V.366, p.478–481, 2002.
- DENG, W., et al. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* V.11, n.5, p.339–350, 2010.
- DERE, E., et al. Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Research Protocols*, no prelo, 2005b.
- DERE, E., et al. Integrated memory for objects, places and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.84, p.214–221, 2005a.
- DERE, E., et al. The case for episodic memory in animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 30, p.1206–1224, 2006.
- DEROCHE, V. Stress-induced sensitization and glucocorticoids: I. Sensitization of dopamine-dependent locomotor effects of amphetamine and morphine depends on stress-induced corticosterone secretion, *J. Neurosci.* V.15, p.7181–7188, 1995.
- DESMOND, N.L. & LEVY, W.B. A quantitative anatomical study of the granule cell dendritic fields of the rat dentate gyrus using a novel probabilistic method. *J. Comp. Neurol.* V.212, p.131-145, 1982.
- DEUTSCH, J.A. The cholinergic synapse and the site of memory. *Science.* V.174, p.788–94, 1974.
- DIX, S.L. & AGGLETON, J.P. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object– location and object– context recognition, *Behav. Brain Res.* V.99, p. 191– 200, 1999.
- DIXON, A.K. et al. Tissue distribution of adenosine receptor mRNA in the rat. *Br. J. Pharmacol.* V.118, p.1461–1468, 1996.
- DOHERTY, M.D. & GRATTON, A. Medial prefrontal cortical D1 receptor modulation of the meso-accumbens dopamine response to stress: an electrochemical study in freely-behaving rats, *Brain Res.* V.715, p. 86– 97, 1996.
- DOLPHIN, A.C., ARCHER, E.R. An adenosine agonist inhibits and a cyclic AMP analogue enhances the release of glutamate but not GABA from slices of rat dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* V.43, p.49–54, 1983.
- DONALD, M. *A Mind So Rare, the Evolution of Human Consciousness.* Norton, New York, 2001.
- DUDLEY, M. Et al. Adenosine A1 receptor antagonists as cognition enhancers, *Drug Dev. Research.* V.31, p.31-266, 1994.

- DUNNE, F., et al. Development of a home cage locomotor tracking system capable of detecting the stimulant and sedative properties of drugs in rats. *Progress in Neuropsychopharmacology, Biology and Psychiatry*. V.31, p.1456-1463, 2007.
- DUNWIDDIE, T.V. The physiological role of adenosine in the central nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* V.27, p.63–139, 1985.
- EACOTT, M.J., et al. Recollection in an episodic-like memory task in the rat. *Learning & Memory*, v.12, p. 221–223, 2005.
- EASTON, A. & PARKER, A. A cholinergic explanation of dense amnesia, *Cortex*, v. 39, p.813–826, 2003.
- EASTON, A., et al. Lesions of the cholinergic basal forebrain and fornix in one hemisphere and inferior temporal cortex in the opposite hemisphere produce severe learning impairments in rhesus monkeys. *Cerebral Cortex*, v. 12, p.729–736, 2002.
- EHRlich, B.E. Functional properties of intracellular calcium release channels. *Current Opinion in Neurobiology*. V. 5, p.304-349, 1995.
- EICHENBAUM, H., et al. Functional organisation of the hippocampal memory system *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* V.93, p.13500–13507, 1996.
- EICHENBAUM, H. How does the brain organise memories? *Science*, v. 277, p.330–332, 1997.
- EICHENBAUM, H., et al. Two functional components of the hippocampal memory system *Behav. Brain Sci.* V.17, p.449–518, 1994.
- EL YACOUBI, M., et al. The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in mouse is not shared by selective A2a adenosine receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*. V.148, p.153-163, 2000.
- ENNACEUR, A., & DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, v.31, p.47–59, 1988.
- ENNACEUR, A., et al. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: The effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Experimental Brain Research*, v.113, p.509–519, 1997.
- EPP, J. R., et al. Activation and survival of immature neurons in the dentate gyrus with spatial memory is dependent on time of exposure to spatial learning and age of cells examination. *Neurobiology of learning and memory*, v. 95, p316-325, 2011.
- EPSTEIN, O. I., ET AL. Plasticity of neuronal responses induced by low concentrations of exogenous ligands affecting cellular calcium stores. *Frontiers in Bioscience*. V. 9, p. 809-815, 2004.
- ERGORUL, C. & EICHENBAUM, H. The hippocampus and memory for “what,” “where,” and “when”. *Learning and Memory*, v. 11, p. 397–405, 2004.
- ERIKSON, G.C., et al. The effects of caffeine on memory for word lists. *Physiology and Behavior*, v.35, p.47-51,1985.
- ERRINGTON, M.L.,et al. Long-term potentiation in the dentate gyrus: induction and increased glutamate release are blocked by D-aminophosphonovalerate. *Neuroscience*, v. 20, p.279–284, 1987.
- ESPOSITO, M.S., et al. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 10074-10086, 2005.
- ESTES, W.K. Memory for temporal information. In: Michon JA, Jackson JL, editors. *Time, mind and behavior*. New York: Springer-Verlag. P. 151–68, 1985.

- FAULKNER, R.L., et al. Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 105, p. 14257-14162, 2008.
- FELDBERG, L.A. & SHERWOOD, P.D. Injections of drugs into the lateral ventricle of the cat. *Journal of Physiology*. V.123, p.148–167, 1954.
- FILE, S.E. NK1 receptor antagonist, has an anxiolytic action in the social interaction test in rats. *Psychopharmacology*, v.152, p.105–109, 2000.
- FILE, S.E., et al. Behavioral effects of acute and chronic administration of caffeine in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. V.30, p.809–815, 1988.
- FILE, S.E., et al. Endogenous acetylcholine in the dorsal hippocampus reduces anxiety through actions on nicotinic and muscarinic1 receptors. *Behav. Neurosci*. V.112, p.352–359, 1998.
- FINE, B. J., et al. Effects of caffeine or diphenhydramine on visual vigilance. *Psychopharmacology*, v.114, p.233–238, 1994.
- FISHER, S. & GUILLET, R. Neonatal caffeine alters passive avoidance retention in rats in an age- and gender-related manner. *Brain Research Developmental*. V.98, p.145–149, 1997.
- FLORIO, C., et al. Adenosine A1 receptors modulate anxiety in CDI mice. *Psychopharmacology*, v.136, p.311–319, 1998.
- FORTIN, N.J., et al. Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. *Nature*, v.431, p.188–191, 2004.
- FRASER, C.M., et al. Purine modulation of dizocilpine effects on spontaneous alternation. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 130, p.334–342, 1997.
- FREDHOLM, B.B. et al. Actions of Caffeine in the Brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*. V. 51, n.1, p. 84-125, 1999.
- FREDHOLM, B.B. et al. Adenosine and brain function. *International Review of Neurobiology*. V.63, p.191–270, 2005.
- FREDHOLM, B.B., et al. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacological Toxicology*. V. 76, p. 93–101, 1995.
- FREDHOLM, B.B., et al. Actions of Caffeine in the Brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*. V. 51, n.1, p. 84-125, 1999.
- FREDHOLM, B.B., et al. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol*, v. 63, p.191-270, 2005.
- FREDHOLM, B.B., et al. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacological Toxicology*. V. 76, p. 93–101, 1995.
- FREDHOLM, B.B., et al. Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine? *Trends in Pharmacological Sciences*. V.1, p.129–132, 1980.
- FREDHOLM, B.B., et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev*. V.53, p.527–552, 2001.
- FREDHOLM, B.B., et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacology Review*. V. 46, p. 143–156, 1994.
- FREWER, L. & LADER, M. The effects of caffeine on two computerized tests of attention and vigilance. *Human Psychopharmacology & Clinical Experimentation*. V.6, p.119–126, 1991.

- FRISCH, C., et al. Stimulus complexity dependent memory impairment and changes in motor performance after deletion of the neuronal gap junction protein connexin36 in mice, *Behav. Brain Res.* V.157, p.117– 185, 2005.
- FURUSAWA, K. Drug effects on cognitive function in mice determined by the non-matching to sample task using a 4-arm maze. *Japanese Journal of Pharmacology.* V.56, p.483-493,1991.
- GAFFAN, D. Dense amnesia in the monkey after transection of fornix, amygdala and anterior temporal stem. *Neuropsychologia*, v.39, p. 51–70, 2001.
- GAFFAN, D. Scene-specific memory for objects: a model of episodic memory impairment in monkeys with fornix transection. *Journal of Cognitive Neuroscience*, v. 6, p.305–320,1994.
- GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. *Science.* V.287, p. 1433–1438, 2000.
- GALINA, Z.H. & AMIT,Z. Interactions between ACTH, morphine, and naloxone and their effects on locomotor behavior, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v.9, p.691– 695, 1985.
- GARRET, B.E. & HOLTZMAN, S.G. Does adenosine receptor blockade mediate caffeine-induced rotational behavior? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.274, p.207–214, 1995.
- GARTHE, A., et al. Adult-generated hippocampal neurons allows the flexible use of spatially precise learning strategies. *Plos ONE*, v. 4, p.5464, 2009.
- GE, S. Et al. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, v.439, n.7076, p.589–593, 2006.
- GE, S. Et al. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neuroscience*, v. 30, p.1-8, 2007.
- GE, S., et al. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol.* V.586, n.16, p.3759–3765, 2008.
- GEVAERD, M.S., et al. Caffeine reverses the memory disruption induced by intranigral MPTP-injection in rats. *Brain Research Bulletin.* V.55, p.101-106, 2001.
- GILAD, G.M. The stress-induced reponse of the septohippocampal cholinergic system. A vectorial outcome of psychoendocrinological interactions. *Psychoneuroendocrinology*, v. 12, p.167–184, 1987.
- GILBERT, P. E., & Kesner, R. P. Memory for objects and their locations: The role of the hippocampus in retention of object-place associations. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.81, p.39–45, 2004.
- GILBERT, P.E. & KESNER, R.P. The role of the dorsal CA3 hippocampal subregion in spatial working memory and pattern separation. *Behavior Brain Research.* V.169, p.142-149, 2006.
- GILBERT, P.E., et al. Dissociating hippocampal subregions: Double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus.* V.11, p.626-636, 2001.
- GILLILAND, K. & BULLOCK, W. Caffeine: a potential drug of abuse. *Advances in Alcohol & Substance of Abuse.* V.3, p. 53-73, 1984.
- GIOVANNINI, M.G., et al. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience*, v. 106, p.43–53, 2001.
- GOBERT, A., et al. Piribedil enhances frontocortical and hippocampal release of acetylcholine in freely-moving rats by blockade of 2-adrenoceptors: a dialysis comparison to other antiparkinson agents in the absence of acetylcholinesterase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* V. 305, p.1–9, 2003.

- GOLD, P.E. Modulation of emotional and non emotional memories: same pharmacological systems, different anatomical systems. In: *Brain and Memory: Modulation and Mediation of Neural Plasticity*. Mcgaugh, J.L., Weinberger, N. & Lynch, G., editors. New York: Oxford University Press, p. 41–74, 1995.
- GOLDBERG, M.P., et al. Adenosine reduces cortical neuronal injury induced by oxygen or glucose deprivation in vitro. *Neurosci. Lett.* V.89, p.323–327, 1988.
- GOODRICH-HUNSAKER, N.J., et al. The interaction and dissociations of the dorsal hippocampus subregions: How the dentate gyrus, CA3, and CA1 process spatial information. *Behaviour Neuroscience.* V.122, p.16–26, 2008.
- GRAY, J.A. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry in to the functions of the septo-hippocampal system*. Oxford, Oxford UP, 1982.
- GREEN, E.J. & GREENOUGH, W.T. Altered synaptic transmission in dentate gyrus of rats reared in complex environments: evidence from hippocampal slices maintained in vitro. *J Neurophysiol*, v.55, p.739-750, 1986.
- GREENE, R.W. & HAAS, H.L. The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* V.36, p.329–341, 1991.
- GRIEBEL, G., et al. Comparison of the behavioural effects of an adenosine A1/A2-receptor antagonist, CGS15943A, and an A1-selective antagonist, DPCPX. *Psychopharmacology*, v.103, p.541–544, 1991.
- GRIFFIN, D.R. & SPECK, G.B. New evidence of animal consciousness. *Animal Cognition*, v.7, p.5–18, 2004.
- GRIFFITHS, D.P. & CLAYTON, N.S. Testing episodic memory in animals. *Physiology and Behavior*, v.73, p.755–762, 2001.
- GRIFFITHS, R.R. & CHAUSMER, A.L. Caffeine as a model drug of dependence: recent developments in understanding caffeine withdrawal, the caffeine dependence syndrome, and caffeine negative reinforcement. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi: Japanese Journal of Psychopharmacology.* V. 20, p. 223–231, 2000.
- GRIFFITHS, R.R., et al. Human coffee drinking: reinforcing and physical dependence producing effects of caffeine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapies.* V.239, p.416-25, 1986.
- GUZOWSKI, J.F., et al. Environment- specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, v. 2, p. 1120-1124, 1999.
- GUZOWSKI, J.F., et al. Recent behavioural history modifies coupling between cell activity and *Arc* gene transcription in hippocampal CA1 neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V.103, p.1077-1082, 2006.
- HAGENA, H. & Manahan Vaughan, D. Frequency facilitation at mossy fiber-CA3 synapses of freely behaving rats contributes to the induction of persistent LTD via an adenosine-A1 receptor-regulated mechanism. *Cereb. Cortex*, v. 20, p.1121–1130, 2010.
- HAIJSZAN, T. & ZABROSZKY, L. Direct catecholaminergic–cholinergic interactions in the basal forebrain. III. Adrenergic innervation of choline acetyltransferase-containing neurons in the rat. *J. Comp. Neurobiol.* V.449, p.141–157, 2002.
- HALL, C.S. Emotional behaviour in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol.* V. 18, p385-403, 1934.
- HALLDNER, L. Et al. The adenosine A1 receptor contributes to the stimulatory but not the inhibitory effect of caffeine on locomotion: a study in mice lacking adenosine A1 and/or A2 receptors. *Neuropharmacology*, v.46, p.1008-1017, 2004.

- HAMPTON, R.R. & SCHWARTZ, B.L. Episodic memory in nonhumans, what, and where, is when? *Current Opinion in Neurobiology*, v.14, p.192–197, 2004.
- HAMPTON, R.R. Rhesus monkeys know when they remember. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p.5359–5362, 2001.
- HAN, M. E. Inhibitory effects of caffeine on hippocampal neurogenesis & function. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. V. 356, p. 976–980, 2007.
- HANNESSON, D. K., et al. Interaction between perirhinal and medial prefrontal cortex is required for temporal order but not recognition memory for objects in rats. *Journal of Neuroscience*, v.24, p.4596–4604, 2004.
- HART, S., Cholinergic inputs to the rat medial prefrontal cortex mediate potentiation of the cardiovascular defensive response by the anxiogenic benzodiazepine receptor partial inverse agonist FG 7142. *Neuroscience*, v. 94, p.1029–1038, 1999.
- HASSELMO, M.E. & GIOCOMO, L.M. Cholinergic modulation of cortical function. *Journal of Molecular Neuroscience*. V.30, p.133-135, 2006.
- HASSELMO, M.E., et al. Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J Neurosci*. V.15, p.5249–5262, 1995.
- HASTINGS, N.B. & GOLD, E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J. Comp. Neurol*. V. 413, p.146-154, 1999.
- HAUBER, W. & BAREISS, A. Facilitative effects of an adenosine A1/A2 receptor blockade on spatial memory performance of rats: selective enhancement of reference memory retention during the light period. *Behav. Brain Res*. V.118, p.43–52, 2001.
- HAUGER, R.L., et al. Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology*, v.123, p.396–405, 1988.
- HAULILCA, I., et al. Preliminary data on the possible hypnogenic role of adenosine. *Journal of Neurochemistry*. V.21, p.1019–1020, 1973.
- HAWKINS, M., et al. Effects of chronic administration of caffeine on adenosine A1 and A2 receptors in rat brain. *Brain Res. Bull*. V.21, p.479–482, 1988.
- HELDT, S.A., ET AL. Hippocampus specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular Psychiatry*. V.12, p.656–670, 2007.
- HIGGINS, G. A., et al. The effect of caffeine to increase reaction time in the rat during a test of attention is mediated through antagonism of adenosine A2a receptors. *Behavioral Brain Research*. V. 185, p. 32-42, 2007.
- HIMMEL, H. M. Safety pharmacology assessment of central nervous system function in juvenile and adult rats: Effects of pharmacological reference compounds. *Journal of Pharmacological & Toxicological Methods*, v. 58, p.129–146, 2008.
- HO, Y. J., et al. Behavioral effects of D-cycloserine in rats: The role of anxiety level. *Brain Research*. V.1043, p.179–185, 2005.
- HOTTE, M., et al. Modulation of recognition and temporal order memory retrieval by dopamine D(1) receptor in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.84, p.85–92, 2005.
- HUANG, Z. L., ET AL. Adenosine a2a, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *National Neuroscience*. V. 8, p. 858-859, 2005.

- HUGHES, R. N. Responsiveness to brightness change in male and female rats following treatment with the partial agonist of the N-methyl-D-aspartate receptor, D-cycloserine. *Behavioural Brain Research*, v.152, p.199–207, 2004.
- HUNSAKER, M.R. & KESNER, R.P. Evaluating the differential roles of the dorsal dentate gyrus, dorsal CA3 and dorsal CA1 during a temporal ordering for spatial locations task. *Hippocampus*. V.18, n.9, p.955-964, 2008.
- HUNSAKER, M.R., et al. The role of the dentate gyrus, CA3a, b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus*, v.18, p.1064–1073, 2008.
- ICHIKAWA, J., et al. Atypical, but not typical, antipsychotic drugs increase cortical acetylcholine release without an effect in the nucleus accumbens or striatum. *Neuropsychopharmacology*, v.26, p.325–339, 2002.
- IKEDA, K., et al. Neuroprotection by adenosine A2A receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* V.80, p.262–270, 2002.
- IMAYOSHI, I. ET AL. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*. *Nature Neuroscience*. V. 11, n.10, p. 1153-1161, 2008.
- IMPAGNATIELLO, F., et al. Adenosine receptors in neurological disorders. *Emerg. Ther. Target*, v. 4, p.635–664, 2000.
- IMPERATO, A. Et al. Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary–adrenocortical axis, *Brain Res.* V.538, p. 111 – 117, 1991.
- INOUE, T. Et al. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain, *Pharmacol. Biochem. Behav.* V.49, p.911 –920, 1994.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*. V.68, p.285–316, 1997.
- IZQUIERDO, J.A. Effect of caffeine on the memory of the mouse. *Psychopharmacology*. V.61, p.29-30, 1979.
- J. WOJTOWICZ, J.M. Adult neurogenesis. From circuits to models. *Behavioural Brain Research*, v.227, p. 490–496, 2012.
- JACKISCH, R., et al. Endogenous adenosine as a modulator of hippocampal acetylcholine release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmakol.* V. 327, p.319–325, 1984.
- JAGASIA, R. et al. GABA- camp response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*, v.29, n.25, p.7966–7977, 2009.
- JAIN, N. Et al. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br J Pharmacol*, v.116, p.2127–2133, 1995.
- JAMES, J.E. *Understanding Caffeine: a Biobehavioral Analysis*. Sage Publications. 1997.
- JAMES, J.E.& STIRLING, K.P. Caffeine: a survey of some of the known and suspected deleterious effects of habitual use. *British Journal of Addiction*. V. 78, p.215–258, 1983.
- JARVIS, M.J. Does caffeine intake enhance absolute levels of cognitive performance? *Psychopharmacology*. V.110, p.45–52, 1993.

- JESSBERGER, S. & KEMPERMANN, G. A. Adult-generated hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *European Journal of Neuroscience*, v. 18, p.2707-2012, 2003.
- JIN, Z.L., et al. The role of theophylline in the improvement of scop-induced learning and memory impairment. *Sheng Li Xue Bao*, v.52, p.390–394, 2000.
- JOHANSSON, B. Et al. Effect of long term caffeine treatment on A1 and A2 adenosine receptor binding and on mrna levels in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* V.347, p.407–414, 1993.
- JOHANSSON, B., et al. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1. V.410, p.517–522, 2001.
- JOHNSON, J. W., & ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, v.325, p.529–531, 1987.
- JOHNSON-KOZLOW, M., et al. Coffee consumption and cognitive function among older adults. *American Journal of Epidemiology*. V.156, p.842–850, 2002.
- JUÁREZ-MÉNDEZ, S., et al. Neonatal caffeine administration causes a permanent increase in the dendritic length of prefrontal cortical neurons of rats. *Synapse*, v. 60, p.450–455, 2006.
- KAPLAN, G.B., et al. Caffeine treatment and withdrawal in mice: Relationships between dosage, concentrations, locomotor activity and A1 adenosine receptor binding. *J Pharmacol Exp Ther.* V.266, p.1563–1572, 1993.
- KAPLAN, M.P. & ABEL, T. Genetic approaches to the study of synaptic plasticity and memory storage. *CNS Spectr.* V.8, p.597–610, 2003.
- KAPLAN, M.S. & BELL, D.H. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *Journal of Neuroscience*. V.4, p.1429–1441, 1984.
- KART-TEKE, E., ET AL. Reinstatement of episodic-like memory in rats by neurokinin-1 receptor antagonism. *Neurobiology of Learning and Memory*.v.87, p.324–331, 2007.
- KART-TEKE, E., ET AL. Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiology of Learning and Memory*. V.85, p.173–182, 2006.
- KEE, N., et al. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, v. 10, p.355-362, 2007.
- KELLER-WOOD, M.E. & DALLMAN, M.F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrinology Reviews*, v.5, p.1–24, 1984.
- KEMPERMANN, G., et al. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. V.386, p. 493–495, 1997.
- KENEMANS, J. L., & LORIST, M. M. Caffeine and selective visual processing. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v.52, p.461–471, 1995.
- KENEMANS, J. L., et al. Caffeine and stroop interference. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v.63, p.589–598, 1999.
- KESNER, R.P. & HUNSAKER, M.R. The temporal attributes of episodic memory. *Behavioural brainresearch*, v.215, p. 299–309, 2010.
- KESNER, R.P. Neural mediation of memory for time: role of the hippocampus and medial prefrontal cortex. *Psychon Bull Rev.* V.5, p.585–596, 1998.
- KESSEY, K., et al. A role for adenosine A2 receptors in the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Brain Res.* V.756, p.184–190, 1997.
- KHISTI, R.T., et al. Gabaergic involvement in motor effects of an adenosine A(2A) receptor agonist in mice. *Neuropharmacology*, v.39, p.1004– 1015, 2000.

- KIM, J.J. & FANSELOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*. V.256, p.675–677, 1992.
- KLAUSNITZER, J. & MANAHAN VAUGHAN, D. Frequency facilitation at mossy fiber-CA3 synapses of freely behaving rats is regulated by adenosine A1 receptors. *J. Neurosci*. V.28, p.4836–4840, 2008.
- KOCH, B., et al. Glucocorticoid binding and control ACTH secretion, *J. Physiol*. V.77, p.923–933, 1981.
- KOCHMAN, L.J., et al. Suppression of hippocampal cell proliferation by short-term stimulant drug administration in adult rats. *European Journal of Neuroscience*. Vol. 29, pp. 2157–2165, 2009.
- KONINCK, Y. De, & MODY, I. The effects of rising intracellular calcium on synaptic GABAA receptor-channels. *Neuropharmacology*. V.35, p.1365-1374, 1996.
- KOPF, S. R., et al. Adenosine and memory storage: effect of A1 and A2 receptors antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*. V.146, p.214-219, 1999.
- KORKOTIAN, E. & SEGAL, M. Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*. V.96, p.12068–12072, 1999.
- KORNEYEV, A.Y. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in memory-related effects of anxiolytics. *Neurobiology of Learning and Memory*. V.67, p.1–13, 1997.
- KOVACS, K.J. & SAWCHENKO, P.E. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *Journal of Neuroscience*, v.16, p.262–273, 1996.
- KUBO, T., et al. Cholinergic mechanism in the lateral septal area is involved in the stress-induced blood pressure increase in rats. *Brain Res. Bull*. V.59, p.359–364, 2003.
- KURIBARA, H., et al. Behavioral evaluation of psycho-pharmacological and psychotoxic actions of methylxantines by ambulatory activity and discrete avoidance in mice. *Journal of Toxicological Science*. V.17, p.81-90, 1992.
- LACEFIELD, C.O., et al. Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 2010.
- LAND, C., & RICCIO, D. C. D-Cycloserine: Effects on long-term retention of a conditioned response and on memory for contextual attributes. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.72, p.158–168,1999.
- LEDENT, C. Et al. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure en mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*. V.388, p.674-678, 1997.
- LEDOUX, J.E. Emotion: clues from the brain. *Annual Review of Psychology*. V.60, p.209-235, 1995.
- LELONG, V., et al. RS 67333 and D-cycloserine accelerate learning acquisition in the rat. *Neuropharmacology, Receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.98, p.9407–9412, 2001.
- LEUNER, B., ET AL. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*. V.16, p.216–224, 2006.
- LEUTGEB, J.K., et al. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, v.315, p.961–966, 2007.
- LEUTGED, J.K. et al. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 if the hippocampus. *Science*, v.315, p.961-966, 2007.

- LI, R., et al. Light and electron microscopic study of cholinergic and noradrenergic elements in the basolateral nucleus of the rat amygdala: evidence for interactions between the two systems. *J. Comp. Neurol.* V.439, p.411–425, 2001.
- LIE, D.C. ET AL. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 44 (2004) 399–421.
- LIEBERMAN, H. R., et al. Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training. *Sea–air land. Psychopharmacology,* v.164, p.250–261, 2002.
- LIEBERMAN, H.R., et al. The effects of caffeine and aspirin on mood and performance. *J Clin Psychopharmacol.* V. 7, p. 315–320, 1987.
- LISMAN, J.E. Relating hippocampal circuitry to function: Recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron,* v. 22, p.233–242, 1999.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology.* V.92, p.180–185, 1987.
- LLEDO, ALONSO & GRUBB. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience.* 7, 179-193, 2006.
- LOIS, C. & ALVAREZ-BUYLLA, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.* V. 264, p.1145–1148, 1994.
- LOKE, W.H. Effects of caffeine on mood and memory. *Physiology & Behavior.* V.44, p.367-372. 1988.
- LOKE, W.H., et al. Caffeine and diazepam: separate and combined effects on mood, memory, and psychomotor performance. *Psychopharmacology.* V.87, p.344–350, 1985.
- LONDOS, C. & WOLFF, J. Two distinct adenosine sensitive sites on adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America.* V.74, p.5482 – 5486, 1977.
- LONG, J. M., & KESNER, R. P. Phencyclidine impairs temporal order memory for spatial locations in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior,* v.52, p.645–648,1995.
- LONZE, B.E. & GINTY, D.D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron,* v. 35, p.605–623, 2002.
- LORIST, M. M., et al. Acute effects of caffeine on selective attention and visual search processes. *Psychophysiology,* v.33, p.354–361, 1996.
- LORIST, M.M. & SNEL, J. Caffeine effects on perceptual and motor processes. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology.* V.102, p.401–413, 1997.
- LORIST, M.M., et al. Aging, caffeine and information processing: an even trelated potential analysis. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology.* V.96, p.453–467, 1995.
- MACHADO-VIEIRA, R., et al. Purinergic dysfunction in mania: an integrative model. *Med. Hypotheses,* v. 58, p.297–304, 2002.
- MAIA, L. DE MENDONÇA, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer’s disease? *European Journal Neurology.* V. 9, p.377-382, 2002.
- MANDILLO, S., et al. Repeated administration of phencyclidine, amphetamine and MK-801 selectively impairs spatial learning in mice: A possible model of psychotomimetic drug-induced cognitive deficits. *Behavioural Pharmacology,* v.14, p.533–544, 2003.
- MARR, D. Simple memory: A theory for archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* V.262, p.23–81, 1971.

- MARTIN, S. J., & MORRIS, R. G. New life in an old idea: The synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus*, v.12, p.609–636, 2002.
- MASINO, S.A., et al. Modulation of hippocampal glutamatergic transmission by ATP is dependent on adenosine A1 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* V.303, p.356–363, 2002.
- MATSUOKA, N., & AIGNER, T. G. D-Cycloserin, a partial agonist at the glycine site coupled to N-methyl-D-aspartate receptors, improves visual recognition memory in rhesus monkeys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 278, p. 891–897,1996.
- MCCLOSKEY, T.C., et al. Antagonism of the anti-conflict effects of phenobarbital, but not diazepam, by the A1 adenosine agonist I-PIA. *Psychopharmacology*, v.102, p.283–290, 1990.
- MCGAUGH, J.L., ET AL. Involvement of the amygdala in the regulation of memory storage. In: *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory*. Mcgaugh, J.L., Bermudez-Rattoni, F. & Prado-Alcala, R.A., editors. Mahwah, NJ: Erlbaum, p. 17–39, 1995.
- MCHUGH, T.J., et al. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science*, v.317, p.94–99, 2007.
- MCILWAIN, H. & POLL, J.D. Adenosine in cerebral homeostatic role: appraisal through actions of homocysteine, colchicine, and dipyridamole. *J. Neurobiol.* V.17, p.39–49, 1986.
- MCNAUGHTON, B.L. & MORRIS, R.G.M. Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci.* V.10, p.408–415, 1987.
- MENZEL, C.R. Unprompted recall and reporting of hidden objects by a chimpanzee (*Pan troglodytes*) after extended delays. *Journal of Comparative Psychology*, v.113, p.426–434, 1999.
- MEYER, L. & CASTON, J. Stress alters caffeine action on investigatory behavior and behavioural inhibition in the mouse. *Behavioural Brain Research*, v. 149, p.87-93, 2004.
- MICZEK, K.A. & LAU, P. Effects of scopolamine, physostigmine and chlordiazepoxide on punished and extinguished water consumption in rats. *Psychopharmacologia*, v. 42, p.263–269, 1975.
- MIKALSEN, A., et al. Effects of caffeine, caffeine-associated stimuli, and caffeine related information on physiological and psychological arousal. *Psychopharmacology.* V.157, p.373–380, 2001.
- MITCHELL, J. B., & LAIACONA, J. The medial frontal cortex and temporal memory: Tests using spontaneous exploratory behaviour in the rat. *Behavioural Brain Research*, v.97, p.107–113,1998.
- MOLINENGO, L., et al. Action of caffeine, L-PIA and their combination on memory retention in the rat. *Life Sciences.* V.54, p. 1247-1250, 1995.
- MONGIAT, L.A. & SCHINDER, A.F. Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *Eur J Neuroscience*, v.33, n.6, p.1055–1061, 2011.
- MOORE, K.A., et al. Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.100, p.14397–14402, 2003.
- MORRIS, R.G.M. & MCNAUGHTON, B.L. Memory storage in a distributed model of hippocampal formation. *Trends in Neuroscience.* V. 10, p.408-414, 1987.

- MUMBY, D. G., et al. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: Memory for objects, places, and contexts. *Learning and Memory*, v.9, p.49–57, 2002.
- MUMFORD, G.K. & HOLTZMAN, S.G. Qualitative differences in the discriminative stimulus effects of low and high doses of caffeine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* V.258, p.857–865, 1991.
- NAGEL, J. A., & HUSTON, J. P. Enhanced inhibitory avoidance learning produced by post-trial injections of substance P into the basal forebrain. *Behavioural and Neural Biology*, v.49, p.374–385, 1988.
- NEHLIG, A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience Biobehavior.* V.23, p.563–576, 1999.
- NEHLIG, A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience Biobehavior.* V.23, p.563–576, 1999.
- NEHLIG, A., et al. Effects of acute administration of caffeine on local cerebral glucose utilization in the rat. *Eur J Pharmacol.* V. 101, p. 91–100, 1984.
- NEHLIG, A., et al. Caffeine and the central nervous system: mechanism of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Review.* V.17, p.139–70, 1992.
- NEHLIG, A., et al. Comparative effects of acute and chronic administration of caffeine on local cerebral glucose utilization in the conscious rat. *Eur J Pharmacol.* V. 129, p. 93–103, 1986.
- NICHOLSON, S.A. Stimulatory effect of caffeine on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in the rat. *Journal of Endocrinology*, v.122, p.535–543, 1989.
- NICKELL, P.V. & UHDE, T.W. Dose–response effects of intravenous caffeine in normal volunteers. *Anxiety*, v.1, p.161–168, 1994.
- NICOLL, R.A. & SCHMITZ, D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat. Rev. Neurosci.*v. 6, p.863–876, 2005.
- NIKBAKHT, M.-R. & STONE, T.W. Suppression of presynaptic responses to adenosine by activation of NMDA receptors. *Eur. J. Pharmacol.* V.427, p.13–25, 2001.
- NIKODIJEVIC, O., et al. Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal. *Pharmacol Biochem Behav.* V. 44, p. 199–216, 1993.
- NORMILE, H. J. & BARRACO, R. A. N⁶-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action A₁ receptors. *Brain Research.* 27: 101-104., 1991.
- NORMILE, H.J., et al. Activation of adenosine A₁ receptors in the nucleus accumbens impairs inhibitory avoidance memory. *Behav. Neural Biol.* V.62, p.163–166, 1994.
- NOSCHANG, C. G., et al. Interactions Between Chronic Stress and Chronic Consumption of Caffeine on the Enzymatic Antioxidant System. *Neurochemistry Research.* 2009.
- O'KEEFE, J. & NADEL, L. *The hippocampus as a cognitive map.* Oxford: Clarendon Press, 1978.
- OBORNE, D.J. & ROGERS, Y. Interactions of alcohol and caffeine on human reaction time. *Aviation, Space and Environmental Medicine.* V.54, p.528–534, 1983.
- OCHIISHI, T., et al. Cellular localization of adenosine A₁ receptors in rat forebrain: immunohistochemical analysis using adenosine A₁ receptor-specific monoclonal antibody. *J. Comp. Neurol.* V.411, p.301–316, 1999.

- OHNO, M., & WATANABE, S. D-Cycloserine, a glycine site agonist, reverses working memory failure by hippocampal muscarinic receptor blockade in rats. *European Journal of Pharmacology*, v.318, p.267–271, 1996.
- OHTANI, N., et al. Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence, *J. Neurosci.* V.23, p.2840–2850, 2003.
- OKADA, M., et al. Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J. Neurosci.* V.21, p.628–640, 2001.
- OLAH, M.E. & STILES, G.L. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* V.35, p.581–606, 1995.
- OLER, J.A., et al. Amygdalar and hippocampal substrates of anxious temperament differ in their heritability. *Nature*, v.466, p.864–868, 2010.
- OWENS, D.F. & KRIEGSTEIN, A.R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neuroscience*, v.3, n.9, p.715–727, 2002.
- PARKER, A., et al. Memory encoding in the primate brain: the role of the basal forebrain, in: A. Parker, E.L. Wilding, T.J. Bussey (Eds.), *The Cognitive Neuroscience of Memory Encoding and Retrieval*, Psychology Press, New York, p. 151–172, 2002.
- PATERSON, D. & NORDBERG, A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.* V.61, p.75–111, 2000.
- PEREIRA, G. S., et al. Blockade of adenosine A1 receptors in posterior cingulate cortex facilitates memory in rats, *European Journal of Pharmacology.* V.437, p.151-154, 2002.
- PHILLIPS, R.G. & LEDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience.* V. 106, p.274–285, 1992.
- PHILLIS, J.W. Adenosine A2A receptor ligands: effects of neuronal excitability. *Drug Dev. Res.* V.52, p.331–336, 2001.
- PHILLIS, J.W., et al. A potent depressant action of adenine derivatives on cerebral cortical neurones. *Eur. J. Pharmacol.* V.30, p.125–129, 1975.
- PIATTI, V.C., et al. The Timing for Neuronal Maturation in the Adult Hippocampus Is Modulated by Local Network Activity. *The Journal of Neuroscience*, v.21, n.31, p.7715–7728, 2011.
- PICCIOTTO, M.R. Knock-out mouse models used to study neurobiological systems. *Crit. Rev. Neurobiol.* V.13, p.103–149, 1999.
- PIETERSEN, A.N., et al. Modulation of gamma oscillations by endogenous adenosine through A1 and A2A receptors in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology*, v. 56, p.481–492, 2009.
- PITKANEN, M., et al. The effects of D-cycloserine, a partial agonist at the glycine binding site, on spatial learning and working memory in scopolamine treated rats. *Journal of Neural Transmission. Parkinson Disease and Dementia Section*, v.9, p.133–144, 1995.
- PITSIKAS, N. & BORSINI, F. The adenosine A1 receptor antagonist BIIP 20 counteracts scopolamine-induced behavioral deficits in the passive avoidance task in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* V.328, p.19–22, 1997.
- PONS, L., et al. Attentional deficits of caffeine in man: comparison with drugs acting on performance. *Psychiatric Research.* V. 23, p. 329–333, 1988.
- POPOLI, P., et al. Adenosine A2A receptor stimulation enhances striatal extracellular glutamate levels in rats. *Eur. J. Pharmacol.* V.287, p.215–217, 1995.

- POSNER, M. I. Hierarchical distributed networks in the neuropsychology of selective attention. In A. Caramazza (Ed.), *Cognitive neuropsychology and neurolinguistics*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum, p. 187–210, 1990.
- PREDIGER, R.D. & Takahashi, R.N. Modulation of short-term social memory in rats by adenosine A1 and A(2A) receptors. *Neurosci. Lett.* V.376, p.160–165, 2005
- PREDIGER, R.D., et al. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behav. Pharmacol.* V.16, p.209–218, 2005a.
- PREDIGER, R.D., et al. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav. Brain Res.*v.159, p.197–205, 2005b.
- PRUT, L. & BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, p 3-33, 2003.
- PUSSINEN, R., & SIRVIO, J. Effects of D-cycloserine, a positive modulator of N-methyl-D-aspartate receptors, and ST 587, a putative alpha-1 adrenergic agonist, individually and in combination, on the non-delayed and delayed foraging behaviour of rats assessed in the radial arm maze. *Journal of Psychopharmacology*, v.13, p.171–179, 1999.
- QUARTERMAIN, D., et al. Acute but not chronic activation of the NMDA-coupled glycine receptor with D-cycloserine facilitates learning and retention. *European Journal of Pharmacology*, v.257, p.7–12, 1994.
- RADULOVIC, J., et al. Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2, *J. Neurosci.* V.19, p.5016– 5025, 1999.
- RALEVIC, V. & BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* V.50, p.413–492, 1998.
- Ralevic, V. & Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* V.50, p.413–492, 1998.
- RAMIREZ-AMAYA, V. Et al. Integration os new neurons into functional neural networks. *J. Neuroscience*, v. 26, p. 12237-12241, 2006.
- REBOLA, N. ET AL. Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-epsps at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron.* V.57, p. 121-134, 2008.
- REDILA, V.A. & CHRISTIE, B.R. Exercise-induced changes in dendrítica structure and complexity in the adult hipocampal dentate gyrus. *Neuroscience*, v. 136, p.1299-1307, 2006.
- RIBEIRO, J.A., et al. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* V.68, p.377–392, 2002.
- RIEDEL, W. J. & JOLLES. J. Cognition enhancers in age-related cognitive decline. *Drugs Aging*, v.8, p.245–274, 1996.
- RIEDEL, W., et al. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. *Psychopharmacology*, v. 122, p.158-168, 1995.
- RITCHIE, K., et al. The neuro-protective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology.* V. 69, p.536–545, 2007.
- RIVIER, C. & VALE, W. Diminished responsiveness of the hypothalamic-pituitary adrenal axis of the rat during exposure to prolonged stress: a pituitary-mediated mechanism. *Endocrinology*, v.121, p.1320–1328, 1987.

- RIVKEES, S.A., et al. Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res.* V. 677, p.193–203, 1995.
- ROBERTS, W. A. Are animals stuck in time? *Psychological Bulletin*, v.128, p.473–489, 2002.
- RODGERS, R.J. & COLE, J.C. Effects of scopolamine and its quaternary analogue in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Behav. Pharmacol.* V.6, p.283–289, 1995.
- ROGERS, J.L. & KESNER, R.P. Cholinergic Modulation of the Hippocampus During Encoding and Retrieval of Tone/Shock-Induced Fear Conditioning. *Learning and Memory.* V.1, n. 11, p.102–107, 2004.
- ROLLS, E.T. & KESNER, R.P. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog Neurobiol.* V.79, p.1–48, 2006.
- ROLLS, E.T. & TREVES, A. *Neural networks and brain function.* Oxford: Oxford University Press, 1998.
- ROLLS, E.T. & TREVES, A. *Neural Networks and Brain Function.* Oxford: Oxford University Press. 1998.
- ROOZENDAAL, B. Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory.* V. 78, p. 578–595, 2002.
- ROSIN, D.L., et al. Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* V.401, p.163–186, 1998.
- ROUSSINOV, K.S. & YONKOV, D.I. Cholinergic mechanisms in the learning and memory facilitating effect of caffeine. *Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica.* V.2, p.61-68, 1976.
- RUIJTER, J., et al. The effects of caffeine on visual selective attention to color: An ERP study. *Psychophysiology*, v.37, p.427–439, 2000.
- RYAN, L., et al. Caffeine reduces time-of-day effects on memory performance in older adults. *Psychological Science.* V.13, p.68–71. 2002.
- S. VILA-LUNA, 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.* V.202, p. 384–395, 2012.
- SAHAY, A. Et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, v. 472, p.466–470, 2011.
- SANSONE, M., et al. Effect of caffeine and nicotine on avoidance learning in mice: lack of interaction. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* V. 46, p.765-767, 1994.
- SAPOLSKI, R.M., et al. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci.* V.10, p.2897–2902, 1990.
- SARTER, M. & BRUNO, J.P. Abnormal regulation of corticopetal cholinergic neurons and impaired information processing in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci.* V.22, p.67–74, 1999.
- SATTIN, A. & RALL, T. W. The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5' phosphates content of guinea pig cerebral cortex slices. *Molecular Pharmacology.* V.6, p.13-23, 1970.
- SAWYER, D.A., et al. Caffeine and human behavior: arousal, anxiety, and performance effects. *Journal of Behavioral Medicine.* V. 5, p.415–439, 1982.

- SAXE, M.D., et al. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 103, 17501-17506, 2006.
- SCHUSTER, G. M., & SCHMIDT, W. J. D-Cycloserine reverses the working memory impairment of hippocampal-lesioned rats in a spatial learning task. *European Journal of Pharmacology*, v.224, p.97-98, 1992.
- SCHWARTZ, B. L., et al. D-Cycloserine enhances implicit memory in Alzheimer patients. *Neurology*, v.46, p.420-424, 1996.
- SCHWARZSCHILD, M.A. ET AL. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends in Neuroscience*. V.29, p.647-654, 2006.
- SCOVILLE, W.B. & MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, v. 20, p.11-21, 1957.
- SEBASTIAO, A.M. & RIBEIRO, J.A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol. Sci*. V.21, p.341-346, 2000.
- SEGAL, M. Acetylcholine enhances NMDA-evoked calcium rise in hippocampal neurons. *Brain Research*, v.587, p.83-87, 1992.
- SETH, P., et al. Nicotinic-serotonergic interactions in brain and behaviour. *Pharmacol. Biochem. Behav.* V.71, p.795-805, 2002.
- SHORS, T. J. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace Memories. *Nature*. V. 410, p. 372-376, 2001.
- SHUI-JIN, H. Et al. Caffeine-dependent stimulus-triggered oscillations in the CA3 region of hippocampal slices from rats chronically exposed to lead. *Experimental Neurology*, v.190, p.525- 534, 2004.
- SILVA, G. C., et al. Blockade of adenosine A2a receptors prevents staurosporine-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. *Neurobiology of Disease*. V.27, p. 182-189, 2007.
- SILVA, R. H. & FRUSSA-FILHO, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *Journal of Neuroscience Methods*. V. 102, p.117-125, 2000.
- SILVA, R. H. Esquiva discriminativa em labirinto em cruz elevado: um novo modelo animal para o estudo das interações entre memória e ansiedade. 2001. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
- SIMONS, S.B., et al. Caffeine-induced synaptic potentiation in hippocampal CA2 neurons. *Nat Neurosci*, no prelo.
- SJOSTROM, P.J. et al. Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiol Rev*. V.88, p.769-840, 2008.
- SMITH, A, et al. Caffeine and the common cold. *Journal of Psychopharmacology*. V. 11, p.319-324, 1997.
- SMITH, A, et al. Caffeine, performance, mood and states of reduced alertness. Special issues: caffeine Research. *Pharmacopsychologia*. V. 7, p.75-86, 1994.
- SMITH, A, et al. Effects of caffeine on human behavior. *Food & Chemical Toxicology*. V.40, p.1243-1255, 2002.
- SMITH, A.P., et al. Breakfast cereal and caffeinated coffee: effects on working memory, attention, mood, and cardiovascular function. *Physiology & Behavior*. V.67,p. 9-17, 1999.
- SMITH, B. D. Et al. Hostility and caffeine: cardiovascular effects during stress and recovery. *Personality & Individual Differences*. V. 30, p. 1125-1137, 2001.

- SMITH, B. D., et al. Chronic and acute effects of caffeine: testing a biobehavioral model. *Physiology & Behavior*. V. 51, p.131–142, 1991.
- SMYTH, J.W., et al. The effects of intrahippocampal scopolamine infusions on anxiety in rats as measured by the black-white box test. *Brain Res. Bull.* V.45, p.89–93, 1998.
- SNYDER, J. S., et al. Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus*, v. 19, p.360-370, 2009a.
- SNYDER, J. S., et al. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing and more involved in behavior in rats than in mice. *J. Neuroscience*, v.29, 14484-14495, 2009b.
- SNYDER, J. S., et al. Septo-temporal gradients of neurogenesis and activity in 13-month-old rats. *Neurobiology of aging*, no prelo, 2009c.
- SNYDER, J.S., et al. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *Journal of Neurophysiology*, v. 6, n. 85, p.2423–31, 2001.
- SNYDER, S. H., et al. Adenosine Receptors and Behavioral Action of Methylxanthines (Caffeine/Theophylline/ N cyclohexyladenosine/N6--phenylisopropyl Adenosine). *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*. V. 78, p. 3260-3264, 1981.
- SOLINAS, M. Et al.Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*. V.22, p.6321–6324, 2002.
- SPILLER, M.A. The Chemical Components of Coffee. In: *Caffeine*. Ed., CRC PRESS Boca Raton: Spiller, G. A., p. 97–161, 1998.
- SQUIRE, L.R., et al. The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience*, v.27, p.279–306, 2004.
- STANFIELD, B.B. & TRICE, J. E. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp. Brain Res.* V.72, p.399-406, 1988.
- STONE, T.W. Purines and neuroprotection. *Adv. Exp. Med. Biol.* V.513, p.249–280, 2002.
- STONER, G.R., et al. Preferential effects of caffeine on limbic and cortical dopamine systems. *Biol Psychiatry*, v. 23, p.761–768, 1988.
- STRAIN, E.C. & GRIFFITHS, R.R., Caffeine dependence: fact or fiction? *Journal of the Royal Society of Medicine*, v.88, p.437-440, 1995.
- STREUFERT, S., et al. Excess coffee consumption in simulated complex work settings: detriment or facilitation of performance? *The Journal of Applied Psychology*. V.82, p.774–782, 1997.
- SUDDENDORF, T. & CORBALLIS, M.C. Mental time travel and the evolution of the human mind. *Genetic Social and General Psychology Monographs*, v.123, p.133–167, 1997.
- SUZUKI, F., et al. Adenosine A1 antagonists. 3. Structure-activity relationships on amelioration against scopolamine- or N6-((R)-phenylisopropyl)adenosine-induced cognitive disturbance. *Journal of Medical Chemistry*. V.36, n.17, p.2508-2518, 1993.
- SVENNINGSSON, P. Et al. Biphasic changes in locomotor behavior and in expression of mrna for NGFI-A and NGFI-B in rat striatum following acute caffeine administration. *J Neurosci*, v.15, p.7612–7624, 1995a.

- SVENNINGSSON, P., et al. Increased expression of c-jun, junb, AP-1, and preproenkephalin mrna in rat striatum following a single injection of caffeine. *J Neurosci*, v.15, p.3583–3593, 1995b.
- SWANSON, T.H., et al. Adenosine A1 receptors are located predominantly on axons in the rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* V.363, p.517–531, 1995.
- TABATA, K., et al. Ameliorative effects of paeoniflorin, a major constituent of peony root, on adenosine A1 receptor-mediated impairment of passive avoidance performance and longterm potentiation in the hippocampus. *Biol. Pharm. Bull.* V.24, p.496–500, 2001.
- TAKETO, M. Calcium-independent inhibition of GABAA current by caffeine in hippocampal slices. *Brain Research*, v. 1016, p.229– 239, 2004.
- TASHIRO, A., et al. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature.* V. 442, p.929–933, 2006.
- TEMPLE, J.G., et al. The effects of caffeine on performance and stress in an abbreviated vigilance task. *Proceedings of the Human Factors and Ergonomics Society 41st Annual Meeting*, Albuquerque, NM, 1293–1297, 1997.
- TERRY, W.S. & PHIFER, B. Caffeine and memory performance on the AVLT. *Journal of Clinical Psychology.* V.42, p.860-863, 1986.
- TONI, N. Et al. Neurons Born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat. Neuroscience.* V. 11, p.901-907, 2008.
- TOZUKA, Y., et al. Gabaergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, v.47, n.6, p.803–815, 2005.
- TRONEL, S. Et al. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus*, no prelo, 2010.
- TROUCHE, S., et al. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V.106, p.5919-5925, 2009.
- TSAI, G. E., et al. Improved cognition in Alzheimer's disease with short-term D-cycloserine treatment. *American Journal of Psychology*, v.156, p.467–469, 1999.
- TULVING, E. & Markowitsch, H.J. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus*, v.8, p.198–204, 1998.
- TULVING, E. Episodic memory: From mind to brain. *Annual Reviews in Psychology*, v.53, p.1–25, 2002.
- UHDE, T.W., et al. Caffeine: Relationship to human anxiety, plasma MHPG and cortisol. *Psychopharmacol Bull.* V.20, p.426–430, 1984.
- VAN CALKER, D., et al. Adenosine regulates, via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Journal of Neurochemistry.* V. 33, p.999 – 1005, 1979.
- VON LUBITZ, D.K., et al. Protection against ischemic damage by adenosine amine congener, a potent and selective adenosine A1 receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* V.369, p.313–317, 1999.
- WALSH, R.N. & CUMMINS, R.A. The open Field test: a critical review. *Psychol. Bull.* V.83, p.481-504, 1976.
- WANG, J.W., et al. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J. Neuroscience*, v. 28, p. 1374-1384, 2008.
- WANG, S., et al. Heterogenous properties of dentate gyrus granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol.* V.42, p.248–257, 2000.
- WARBURTON, D.M. Effects of caffeine on cognition and mood without caffeine abstinence. *Psychopharmacology.* V.119, p.66–70, 1995.

- WEEBER, E.J., et al. A role of the isoform of protein kinase C in fear conditioning. *J. Neurosci.* V.20, p.5906–5914, 2000.
- WEISZ, V.I. & ARGIBAY, P.F. A putative role for neurogenesis in neurocomputational terms: inferences from a hippocampal model. *Cognition*, v.112, p.229–240, 2009.
- WENTZ, C.T. & MAGAVI, S.S.P. Caffeine alters proliferation of neuronal precursors in the adult hippocampus. *Neuropharmacology.* V. 56, p. 994–1000, 2009.
- WESENSTEN, N. J., et al. Performance and alertness effects of caffeine, dextroamphetamine, and modafinil during sleep deprivation. *Journal of Sleep Research.* V.14, p.255–266, 2005.
- WINTERS, B. D., & BUSSEY, T. J. Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *Journal of Neuroscience*, v.25, p.52–61, 2005.
- WONNACOTT, S. Presynaptic nicotinic ach receptors. *Trends Neurosci.* V.20, p.92–98, 1997.
- WU, M., et al. Cholinergic excitation of septohippocampal GABA but not cholinergic neurons: implications for learning and memory. *J. Neurosci.* V.20, p.3900–3908, 2000.
- XIANG, X., et al. Hippocampal glur1 associates with behavior in the elevated plus maze and shows sex differences. *Behav Brain Res.* V.222, p.326–331, 2011.
- YAMATO, T., et al. Modulation of the stress response by coffee: an in vivo microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat. *Neuroscience Letters*, v.332, p.87–90, 2002.
- YONELINAS, A. P. The nature of recollection and familiarity: A review of 30 years of reseach. *Journal of Memory and Language*, v.46, p.441–517, 2002.
- YONKOV, D.I. Correlations between the effects of CNS stimulants on memory processes and open field behavior of rats: the importance of brain cholinergic activity. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology.* V.7, p.113-118, 1985.
- YONKOV, D.I. Possible role of brain dopaminergic systems in the memory effects of central stimulants. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology.* V.6, p.235-239, 1984.
- YOSHIMURA, H., et al. Age-dependent emergence of oscillatory signal flow between the primary and secondary visual cortices in rat brain slices. *Brain Research.* V.990, p.172-181, 2003.
- YOSHIMURA, H., et al. The Potential of Caffeine for Functional Modification from Cortical Synapses to Neuron Networks in the Brain. *Current Neuropharmacology.* V.3, p.309-316, 2005.
- ZAJACZKOWSKI, W. & DANYSZ, W. Effects of D-cycloserine and aniracetam on spatial learning in rats with entorhinal cortex lesions. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.56, p.21–29, 1997.
- ZARRINDAST, M. R. & SHAFAGHI, B. Effects of adenosine receptor agonists & antagonists on acquisition of passive avoidance learning. *European Journal of Pharmacology.* V.256: p.233-239, 1994.
- ZEITLIN, et al., Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice. *Brain Research*, v. 1417, p. 127 – 136, 2011.

- ZHANG, Q. ET AL. Spatiotemporal properties of locomotor activity after administration of central nervous stimulants and sedatives in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*. V. 97, p. 577-585, 2011.
- ZHAO, C., et al. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 2006;26(1):3–11.
- ZIMMERMANN, H. Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflügers Arch*. V.452, p.573–588, 2006.

ANEXO 1

¹Potenciação de longo-prazo (LTP): fenômeno de repetida estimulação elétrica de aferentes que produz um aumento na excitabilidade neuronal e acredita-se ser um mecanismo de lembrança de eventos. Tanto a LTP, quanto a LTD são sugeridas como mecanismos funcionais para estocagem de memória no cérebro de mamíferos (Encyclopedia of Neuroscience).

²Depressão de longo-prazo (LTD): fenômeno em que a ativação cumulativa de aferências a caminhos neurais específicos produz decréscimo na excitabilidade de neurônios. É conhecida como forma de plasticidade sináptica dependente de atividade e proposta como mecanismo de esquecimento ao envolver o hipocampo (Encyclopedia of Neuroscience).

³Depotenciação: é a redução ou reversão da LTP. É o fenômeno produzido após a saturação de LTP (estímulo tetânico - 100Hz, 100 pulsos), quando são aplicados estímulos de baixa frequência (1 Hz, 1000 pulsos). A depotenciação reduz o componente potenciado de potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo (PEPS) e a amplitude de disparo da população (Fujii, et al., 1992).

⁴Separação de padrões: é o processo de transformação de representações similares ou memórias em representações altamente dissimilares e não-sobrepostas (Marr, 1971; Bakker, et al. 2008). O giro denteado cria representações esparsas ou ortogonalizadas das informações provenientes do córtex entorrinal e projeta para CA3 via fibras musgosas (Treves & Rolls, 1994).

⁵Células de lugar: São células hipocampais que representam o espaço formando mapas (representações internas do ambiente) e servindo para a localização dos animais. Foram descobertas em 1971, por O'Keefe & Dostrovsky, quando faziam gravações da atividade de células hipocampais em ratos movendo-se livremente, correlacionando a atividade celular ao comportamento, notaram que determinadas células disparavam em certas regiões do espaço e não em outras. À representação interna da célula de lugar formando um correlato espacial cognitivo chama-se campo de lugar. São formados rapidamente quando os animais são expostos a um novo meio (Hill, 1978; Wilson & McNaughton, 1993), sendo estáveis por semanas ou meses (Muller, et al., 1987;Thompson & Best, 1990) e guiados por pistas espaciais (O'Keefe & Conway, 1978). Podem ser formados por variáveis não espaciais como direção ou orientação (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; revisão de Wiener, 1996; McNaughton, et al., 1983; Muller et al., 1994; Markus et al., 1995), mas a localização espacial é o correlato mais consistente de sua atividade. As células de lugar possuem as propriedades de estabilidade, permitindo a codificação estável do meio e, de flexibilidade que permite a atualização constante do mapa cognitivo devido a mudanças do meio (revisão de Hok & Save, 2011).

⁶Completção de padrões: é o processo realizado por CA3 para completar informações provenientes do giro denteado, ao agregar ou discriminar padrões parciais. As células piramidais interconectadas recorrentes de CA3 operam como uma rede de auto-associação capaz de restabelecer padrões de ativação estocados previamente baseados

em ruído ou pistas degradadas. A memória declarativa tipo-episódica baseia-se na habilidade de ortogonalizar padrões similares ou sobrepostos de ativação (separação de padrões) e de completar padrões parciais ou discriminar padrões similares de ativação (completação de padrões) (Marr, 1971).

ANEXO 2



Universidade Federal do Rio Grande do Norte COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Natal (RN), 03 de agosto de 2009.

Prezada Professora Dra. REGINA HELENA DA SILVA,


Vimos, através deste documento, informar que o projeto "EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA OU CRÔNICA DE CAFEÍNA SOBRE A AMNÉSIA INDUZIDA POR ESCOPOLAMINA EM RATOS", **protocolo nº 021/2009**, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: **Fevereiro de 2010** (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,


Elaine C. Gavioli
Coordenadora da CEUA



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PROTOCOLO N.º 021/2009 (Adendo)

Professor/Pesquisador: REGINA HELENA DA SILVA

Natal (RN), 10 de agosto de 2011.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que o ADENDO do projeto "EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DE CAFEÍNA SOBRE A AMNÉSIA INDUZIDA POR ESCOPOLAMINA EM RATOS", protocolo nº 021/2009, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: **DEZEMBRO de 2011** (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,

Elaine C. Gavioli
Coordenadora da CEUA



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PROTOCOLO N.º 021/2009 (Adendo N.º 2)

Professor/Pesquisador: *REGINA HELENA DA SILVA*

Natal (RN), 15 de março de 2012.

Prezado Professor/Pesquisador,

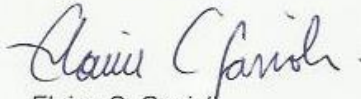
Vimos, através deste documento, informar que o ADENDO do projeto "EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DE CAFEÍNA SOBRE A AMNÉSIA INDUZIDA POR ESCOPOLAMINA EM RATOS", **protocolo n.º 021/2009**, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão:

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: **MAIO de 2012** (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,


Elaine C. Gavioli
Coordenadora da CEUA