

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
CAROLINE MARTINELLO

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ADENOSINÉRGICO NO EFEITO
HIPERLOCOMOTOR DO NEUROPEPTIDO S EM CAMUNDONGOS

CRICIÚMA, JANEIRO 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CAROLINE MARTINELLO

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ADENOSINÉRGICO NO EFEITO
HIPERLOCOMOTOR DO NEUROPEPTIDO S EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Carina
Rodrigues Boeck

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Elaine
Cristina Gavioli

CRICIÚMA, JANEIRO DE 2009

AGRADECIMENTOS

À Prof(a). Dr(a). Elaine Cristina Gavioli, pela paciência e boa vontade desde o início.

À Prof(a). Dr(a). Carina Rodrigues Boeck, que me acolheu durante o período final.

À minha família, que me ajudou durante todo esse tempo.

Aos meus colegas de laboratório Morgana Moretti, Tiago Casagrande e Adalberto Castro, que sempre estavam ao meu lado aprendendo e principalmente ensinando.

Aos demais bolsistas que me acolheram de braços abertos desde o início.

À Prof(a). Dr(a). Lisiane Tuon, pelo incentivo de sempre estudar e levar a classe de fisioterapeutas à frente.

Aos demais professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), pelo conhecimento e amizade que serão levados ao longo da vida.

RESUMO

O Neuropeptídeo S (NPS), foi descoberto em 2002 por Sato e colaboradores. É um peptídeo formado por 20 aminoácidos com a seguinte seqüência: SFRNGVGTGMKKTSFQRAKS, fragmentado de um precursor polipeptídico que estimula o receptor neuropeptídeo S (NPSR) por induzir tanto Gs e Gq, assim como, aumentar a adenosina monofosfato cíclico (AMPC) intracelular e os íons de cálcio. Estudos anteriores demonstraram que o NPS possui efeitos biológicos muito parecidos com os da cafeína, como a diminuição da ingestão alimentar, aumento do tempo de vigília, diminuição dos estágios do sono REM e NREM, aumento da atividade locomotora e diminuição do tempo de repouso. Os mecanismos que medeiam os efeitos estimulatórios da cafeína ainda não estão completamente esclarecidos. Diante destes fatos, o presente trabalho visa investigar uma possível interação entre a cafeína e o neuropeptídeo S na locomoção espontânea de camundongos submetidos ao teste de monitoramento da atividade locomotora, e a administração de antagonistas dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A}, envolvidos na regulação dos efeitos comportamentais induzidos pela exposição aguda à cafeína e ao NPS. Para atingir os objetivos um grupo de camundongos foram pré-tratados com cafeína 3mg/kg (dose inativa), 15 minutos antes da administração de NPS 0,1nmol (dose ativa). Após, foram monitorados durante 30 minutos na caixa de atividade locomotora. Os animais sob efeito somente da dose de 0,1nmol de NPS tiveram um aumento significativo da atividade locomotora, já esperado. Já os animais com o pré-tratamento da dose inativa de cafeína (3mg/kg) antes da dose ativa de NPS (0,1nmol), tiveram uma redução da atividade locomotora ao nível do grupo controle. Após essas análises outro grupo de camundongos foram co-tratados i.c.v. com CPT (100nM, 1µl), um antagonista seletivo de A₁, e NPS 0,1nmol. Após os animais foram monitorados durante 30 minutos na caixa de atividade locomotora. Os animais com tratamento somente de NPS (0,1nmol), tiveram um aumento significativo da atividade locomotora, como já esperado. Já os animais com o co-tratamento de NPS (0,1nmol) e CPT (100nM, 1µl), tiveram um aumento ainda maior da atividade locomotora em comparação ao grupo com tratamento somente com NPS. Durante os primeiros 5 minutos de co-tratamento o aumento foi significativamente maior e após houve uma redução, mas sempre se manteve maior que o grupo com tratamento somente com NPS. Por ultimo, os animais foram co-tratados i.c.v. com ZM241385 (100nM, 1µl), um antagonista seletivo de A_{2A}, e NPS 0,1nmol. Após os animais foram monitorados na caixa de atividade locomotora durante 30 minutos. Os animais com tratamento somente com NPS (0,1nmol) tiveram um aumento significativamente maior que o controle como o esperado. Já os animais com o co-tratamento ZM241385 e NPS tiveram uma redução significativa em comparação ao grupo NPS, mas não ao grupo controle. Entretanto, esta é a primeira evidência da interação dos receptores adenosinérgicos com o NPS. Mais pesquisas serão necessárias.

Palavras chaves: Neuropeptídeo S (NPS), adenosina, cafeína, atividade locomotora.

ABSTRACT

The neuropeptide S (NPS), was discovered in 2002 by Sato and collaborators. It is composed of 20 amino acid peptide with the following sequence: SFRNGVGTGMKKTSFQRAKS, fragments of a precursor polypeptide that stimulates the receptor neuropeptide S (NPSR) by inducing both Gs and GQ, as well as increase the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and intracellular ion of calcium. Previous studies have shown that the NPS has biological effects very similar to those of caffeine, such as the decrease in food intake, increase in stand-by time, decrease of the stages of NREM and REM sleep, increased locomotor activity and decrease the time to rest. Considering these facts, this paper aims to investigate a possible interaction between caffeine and neuropeptide Y in spontaneous locomotion of mice tested with the monitoring of locomotor activity, and administration of receptor antagonists of adenosine A1 and A2A, involved in the regulation of behavioral effects induced by acute exposure to caffeine and the NPS. To achieve the goals a group of mice were pre-treated with caffeine 3mg/kg (inactive dose), 15 minutes before the administration of 0.1 nmol NPS (active dose). After that, were monitored for 30 minutes in the box motility. The animals in effect only the dose of 0.1 nmol of NPS had a significant increase in locomotor activity, as expected. But the animals with the pre-treatment of inactive dose of caffeine (3mg/kg) before the active dose of NPS (0.1 nmol) had a reduction in locomotor activity in the control group. After these tests another group of mice were co-treated ICV with CPT (100nM, 1µl), a selective antagonist of A1, and 0.1 nmol NPS. After the animals were monitored for 30 minutes in the box motility. The only treatment of animals with NPS (0.1 nmol), had a significant increase in locomotor activity, as I expected. But the animals with the co-treatment of NPS (0.1 nmol) and CPT (100nM, 1µl), had an even greater increase in locomotor activity compared with the group treated only with NPS. During the first 5 minutes of co-treatment the increase was significantly higher and after there was a reduction, but still remained higher than the group with treatment only with NPS. Finally, the animals were co-treated i.c.v. with ZM241385 (100nM, 1µl), a selective antagonist of A2A, and 0.1 nmol NPS. After the animals were monitored in the box of locomotor activity for 30 minutes. The animals treated only with NPS (0.1 nmol) had increased significantly higher than the control as expected. But the animals with the co-treatment ZM241385 and NPS had a significant reduction compared to the group NPS, but not the control group. However, this is the first evidence of the interaction of receptors adenosinergic with the NPS. Further research will be needed.

Key words: Neuropeptide S (NPS), adenosine, caffeine, locomotor activity

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt – Proteína cinase B

AMPC – Adenosina monofosfato cíclico

ATP – Tri-fosfato de adenosina

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CPT - Ciclopentil-1,3-dimetilxantina – antagonista específico do receptor A₁ de adenosina

DARPP-32 – AMPC de 32kDa

ERK – Cinase extracelular

GABA – Ácido γ aminobutírico

GPCR – Receptor acoplado a proteína G

Gi – Proteína G inibidora da adenilato ciclase

Gq – Proteína G ativadora da fosfolipase C

Gs – Proteína G ativadora da adenilato ciclase

GSK-3 – Glicogênio sintase cinase-3

I.C.V. – Intracerebroventricular

MAPKs – Proteínas cinases ativadas por mitógeno

NPS – Neuropeptídeo S

PKA – Proteína cinase dependente de AMPC

RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro

VIP – Peptídeo intestinal vasoativo

ZM 241385 - 4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazol[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol)

– antagonista específico do receptor A_{2A} de adenosina

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	02
RESUMO	03
ABSTRACT	04
LISTA DE ABREVIATURAS	05
1. INTRODUÇÃO	07
1.1. Neuropeptídeo S	07
1.2. Sistema Adenosinérgico	10
1.3. Cafeína.....	12
2. OBJETIVOS	15
Objetivo Geral	15
Objetivos Específicos	15
3. ARTIGO	16
ARTIGO 1 (Neuropharmacology)	16
4. DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÃO	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1. NEUROPEPTÍDEO S

Os transtornos do sono e da ansiedade afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Dentre os sistemas de neurotransmissores envolvidos nestas patologias destacam-se: a noradrenalina, a acetilcolina, a serotonina, o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA). Além destes sistemas de neurotransmissores, freqüentemente são descobertos outros reguladores endógenos que participam da modulação do comportamento. Muitos neurotransmissores são ativados interagindo com os receptores acoplados a proteína G (GPCRs), que representam atualmente o alvo mais importante para a descoberta de novos neurotransmissores (Bear et al., 2002; Lent, et al, 2005).

De fato, nos últimos anos, com o uso de técnicas de biologia molecular, GPCRs órfãos foram clonados e serviram de alvos para a identificação de seus ligantes endógenos, sendo que deste modo, vários sistemas de neurotransmissores, especialmente peptídicos, foram reconhecidos e identificados (Roth et al., 2006).

Uma das descobertas mais recentes foi o neuropeptídeo S (NPS), descoberto em 2002 por Sato et al. O NPS é um peptídeo formado por 20 aminoácidos com a seguinte seqüência: SFRNGVGTGMKKT SFQRAKS; fragmentado de um precursor polipeptídico que ativa o seu receptor (NPSR) por estimular tanto proteína Gs (tem efeito estimulatório na célula) e proteína Gq (aumenta a atividade da fosfolipase C, que degrada fosfolipídios da membrana aumentando a concentração citoplasmática de trifosfato de inositol, que por sua vez aumenta a concentração de cálcio no citoplasma) (Vendelin et al, 2006).

O NPS humano ativa um receptor pertencente à família GPCR, o NPSR, que possui uma topologia transmembrana de sete domínios. O NPSR humano tem duas transcrições alternadas (isoformas), referidas como NPSRh1-A e NPSRh1-B (Vendelin et al, 2006).

O NPS manteve-se bastante preservado através da evolução das espécies, pois seqüências altamente similares ao precursor do NPS humano foram encontradas em outras espécies de vertebrados terrestres, incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios. A estrutura do precursor NPS está inteiramente ou parcialmente ausente no genoma dos peixes de várias espécies, assim como em invertebrados, incluindo insetos, anelídeos, moluscos ou cnidários. Com esses dados pode-se concluir que a evolução do gene precursor do NPS nos vertebrados terrestres coincide com o aparecimento dos primeiros quadrúpedes. Uma implicação possível para a ocorrência restrita do NPS em quadrúpedes seria o desenvolvimento do ciclo sono/vigília em vertebrados terrestres. Onde há um período de sono com perda da consciência corporal e diminuição das contrações musculares. A conservação evolucionária da seqüência do NPS indica que as estruturas do amino-terminal (N-terminal) são as mais importantes para a atividade biológica do peptídeo, pois os sete primeiros aminoácidos do NPS são conservados (Reinscheid, 2007). Mas foi o resíduo serina da porção N-terminal, que está presente em todas as espécies até agora pesquisadas, que deu o nome ao neuropeptídeo “S” (Xu et al., 2004).

Estudos de hibridização *in situ* revelam que o RNAm do NPSR é expresso extensamente por todo o SNC, principalmente no córtex, tálamo, hipotálamo e amígdala e em menor quantidade no tronco cerebral (Xu et al 2004; Reinscheid & Xu, 2005). Já o RNAm para o NPS, encontra-se fortemente expresso próximo ao locus cerúleo (LC), onde se localizam os corpos celulares de neurônios noradrenérgicos, e na amígdala e hipotálamo de ratos (Xu, et al 2004; Reinscheid & Xu, 2005).

Uma análise farmacológica das células que expressam o receptor de NPS mostrou que concentrações nanomolares do precursor do NPS produzem aumento no Ca^{+2} intracelular livre, além de ativar a enzima adenilato ciclase levando a um aumento da síntese de cAMP e também causando ativação de proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs). Estes

achados indicam que o neuropeptídeo S pode se comportar como um neuromodulador (Xu *et al.*, 2004).

Xu e colaboradores (2004) descreveram, pela primeira vez, algumas ações biológicas promovidas pelo NPS. Estes autores demonstraram que a administração de NPS auxilia na regulação do sono-vigília, da ansiedade e do comportamento locomotor de roedores. Além dessas alterações, em outros estudos foi observado que a administração de NPS promove um efeito hiperlocomotor em camundongos e ratos, além de alterações no comportamento alimentar de roedores e pombos (Roth *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2005). O NPS demonstrou um tempo maior de exploração em uma bateria de testes (caixa luz-escuro, labirinto de cruz elevada), similar aos efeitos de drogas ansiolíticas (Rainer *et al.*, 2005).

O perfil dos efeitos comportamentais evocados pela administração icv de NPS (locomoção e vigília junto com efeitos ansiolíticos) parece ser completamente originais porque estimulantes como a anfetamina e a cocaína induzem esse potencial de comportamento, mas ao mesmo tempo são ansiogênicos e, enquanto que, ansiolíticos como os benzodiazepínicos produzem efeitos sedativos. Em resumo, o NPS pode produzir um efeito independente de comportamento e aliviar as respostas de ansiedade provocadas pelos ambientes estressantes e estranhos (Roth *et al.*, 2006).

Em 2006, Lage e colaboradores identificaram que a expressão do NPS e do seu receptor era alterada em ratos após exposição à cafeína por duas ou 48 horas. Estes autores demonstraram que a exposição à cafeína após duas horas causou diminuição do RNAm para o NPS e aumento do RNAm para o receptor do NPSR no tronco cerebral de ratos. Porém, após 48 horas do tratamento houve aumento do RNAm para o receptor NPSR no hipotálamo de ratos, enquanto que não houve alteração da expressão de RNAm para o NPS e para o NPSR nas outras áreas cerebrais estudadas. O autor sugere que o NPS pode modular algumas das

ações comportamentais induzidas pela cafeína. Além disso, parece haver uma relação entre o sistema peptidérgico do NPS e o sistema adenosinérgico constituído pelos receptores A_1 e A_{2A} , principalmente porque a cafeína atua como antagonista não seletivo destes receptores.

1.2. SISTEMA ADENOSINÉRGICO

No cérebro, a adenosina está envolvida nos processos fisiológicos e patológicos, incluindo regulação do sono, excitação, neuroproteção e epilepsias (Dunwiddie e Masino, 2001).

A adenosina, que é um nucleosídeo formado pela união de uma adenina e uma ribose, atua no sistema nervoso central como um modulador. A adenosina não é considerada um neurotransmissor, visto que esta não se encontra estocada em vesículas no terminal pré-sináptico e não é liberada para a fenda sináptica como um neurotransmissor clássico (Burnstock, 2007). No entanto, a adenosina pode chegar à fenda sináptica de outras maneiras como a partir:

- a) da degradação do ATP extracelular por ecto-nucleotidasas;
- b) da sua liberação para a fenda sináptica promovida por transportadores bidirecionais, que também têm a função de captar a adenosina presente no meio extracelular;
- c) da conversão enzimática de AMPc extracelular em adenosina (Burnstock, 2007; Lara, 2004).

A adenosina pode ser liberada pela maioria das células, incluindo neurônios e células da glia. Ao ser liberada, a adenosina modula a atividade do SNC por agir em receptores pré ou pós-sinápticos. A adenosina medeia os seus efeitos através da ativação dos receptores A_1 e A_{2A} , com os quais possui maior afinidade em situações fisiológicas, ou através da ativação de receptores A_{2B} e A_3 , com os quais possui menor afinidade, porém estes

receptores parecem desempenhar um papel relevante principalmente em condições patológicas (Burnstock, 2007).

Os receptores A_1 e A_3 inibem a enzima adenilato ciclase, levando a diminuição no AMPc e nas concentração de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), por uma via que envolve a ativação da fosfolipase C (Abbracchio et al, 1995; Fredholm et al, 2001).

Os receptores do tipo A_1 são do tipo $G_{i/o}$ e quando ativados promovem inibição da adenilato ciclase, ativação de canais de potássio e inibição de canais de cálcio. Os receptores A_1 possuem uma ampla distribuição no hipocampo, córtex cerebral, cerebelo e em alguns núcleos hipotalâmicos (Rivkees et al., 1995). A maioria dos receptores A_1 estão localizados em terminações nervosas pré-sinápticas, onde funcionam como mediadores da inibição exercida pela adenosina na liberação de neurotransmissores (Fredholm et al., 1988), incluindo glutamato, dopamina e acetilcolina (Flagmeyer et al., 1997; Dunwiddie et al., 1980). Provavelmente esses efeitos sejam exercidos através da membrana celular hiperpolarizada, causando ativação da proteína G inibitória, ativando canais de potássio e inibindo canais de cálcio (Trussel et al., 1985; Macdonald et al., 1986).

Já os receptores A_{2A} e A_{2B} quando estimulados, levam a ativação da enzima adenilato ciclase, aumentando a concentração intracelular de AMPc. Os receptores adenosinérgicos A_{2A} são acoplados a proteínas G_s/olf , que ativam adenilato ciclase, aumentando AMPc e conseqüentemente elevando as concentrações intracelulares de cálcio (Hervé et al., 2001; Fisone et al, 2004). A expressão dos receptores A_{2A} está limitada a regiões dopaminérgicas, principalmente ao estriado e tubérculo olfativo (Jarvis et al., 1989). No corpo estriado, os receptores A_{2A} são amplamente expressos nos neurônios pós-sinápticos (Schiffman et al., 1991) onde estas células desempenham um papel crucial no funcionamento dos glânglios basais, que são núcleos envolvidos no controle de movimentos voluntários, bem como motivacionais e locomotores (Fisone et al., 2004).

Estudos demonstram que a ativação de receptores de adenosina influencia a ação de neurotransmissores clássicos, como a dopamina, e neuromoduladores, como o VIP (peptídeo intestinal vasoativo) (Cunha-Reis et al., 2008) e o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (Sebastiao et al., 2000). Deste modo, sugere-se que a adenosina atua no SNC promovendo uma ação reguladora fina sobre o funcionamento sináptico e esta modulação tanto pode ocorrer sobre neurotransmissores clássicos quanto sobre outros moduladores de função neuronal, como é o caso do neuropeptídeo S. Segundo Sebastiao e Ribeiro, 2000, os receptores A_1 inibem a ação do CGRP e os receptores A_{2A} ativam o funcionamento do CGRP na região de CA1 do hipocampo de ratos, funcionando como moduladores das ações sinápticas desse neuropeptídeo excitatório. Além disso, evidências sugerem que receptores que atuam modulando positivamente a adenilato ciclase, como é o caso do NPSR, dos receptores α -adrenérgicos e do CGPR, poderiam ter suas ações facilitadas pela ativação tônica de receptores A_{2A} (Sebastiao e Ribeiro, 2000).

Há um envolvimento diferente dos receptores A_1 e A_{2A} na modulação do comportamento locomotor. Segundo Florio et al, 1997, doses baixas de antagonistas dos receptores de A_1 (CPT, PD115,199 e PACPX) deprimem a locomoção, enquanto doses baixas de agonistas (NECA e CCPA) aumentam a locomoção espontânea. Diante deste contexto, o sistema adenosinérgico, principalmente dos receptores A_1 e A_{2A} , podem ter um envolvimento nas ações hiperlocomotoras do neuropeptídeo S.

1.3. CAFEÍNA

A cafeína é uma substância psicoestimulante muito popular, naturalmente encontrada no café, em chás, em refrigerantes e no chocolate. Possui a fórmula $C_8H_{10}N_4O_2$, classificada como alcalóide do grupo das xantinas e designado quimicamente como *1,3,7-trimetilxantina* (Yacoubi et al, 2000). Após a ingestão, a cafeína é eficientemente absorvida pelo trato

gastrointestinal e, devido as suas características hidrofóbicas, é distribuída rapidamente pelo organismo (Jerrold et al., 2005). Uma grande porcentagem da população consome cafeína cronicamente como uma parte regular da dieta (Fredholm et al., 1995). Beber café habitualmente (2-3 copos de 150 ml/dia) oferece cafeína suficiente para afetar positivamente o desenvolvimento psicomotor e cognitivo humano (James, 1997). Em contraste, doses elevadas de cafeína (300mg/kg/dia) podem produzir efeitos negativos como, nervosismo, ansiedade e distúrbios do sono (Benowitz, 1990). De uma maneira geral, a cafeína produz várias ações no sistema nervoso central (SNC), tais como aumento da vigília, da atenção, da irritabilidade, da agitação e redução do tempo de sono, por atuar em diferentes áreas do cérebro e em distintos sistemas de neurotransmissão (Fisone et al., 2004).

A cafeína é um antagonista de dois tipos de receptores adenosinérgicos, A_1 e A_{2A} . O controle da neurotransmissão inibitória exercida pela adenosina via receptores A_1 , tem efeito positivo na inibição dos efeitos excitatórios da cafeína. Atualmente, a maioria dos efeitos bioquímicos e comportamentais da cafeína tem sido relacionada com a capacidade de esta reduzir a inibição exercida pela adenosina na transmissão dopaminérgica estriatal (Rainnie et al., 1994).

Três mecanismos foram propostos para explicar os efeitos estimulatórios da cafeína na atividade locomotora. Um deles é através da interação da dopamina/adenosina, que envolve os receptores A_{2A} da adenosina. Os receptores A_{2A} interagem com os receptores para dopamina elevando os níveis de dopamina no sangue. O segundo, é com o antagonista A_1 da adenosina presente nos neurônios do prósencefalo. Os receptores A_1 ativados provocam a inibição da liberação de neurotransmissores como o glutamato e a dopamina, assim como a inibição da atividade neuronal por hiperpolarização pós-sináptica. Desta forma, a cafeína, agindo nesses receptores, seria capaz de inibir os efeitos da adenosina, provocando efeitos estimulantes. O terceiro mecanismo seria pelo bloqueio da enzima fosfodiesterase,

responsável pela degradação intracelular de AMPc, como consequência, há um aumento da concentração do AMPc intracelular, produzindo efeitos que mimetizam os dos mediadores que estimulam a atividade da adenilato ciclase, como os da adrenalina, persistindo por mais tempo (Fisone et al., 2004).

A exposição à cafeína aguda ou cronicamente é capaz de alterar os efeitos farmacológicos de outros psicoestimulantes, como a anfetamina, cocaína e nicotina, causando tolerância ou sensibilização (Gasior et al., 2000; Palmatier et al., 2003; Celik et al., 2006).

Estudos anteriores demonstraram que o NPS possui efeitos biológicos muito parecidos com os da cafeína, como a diminuição da ingestão alimentar, aumento do tempo de vigília, diminuição dos estágios do sono REM e NREM, aumento da atividade locomotora e diminuição do tempo de repouso (Xu et al., 2004; Smith et al. 2006).

Sendo assim, estes dados indicam que o sistema da cafeína tem efeitos importantes em muitos dos mesmos fenômenos comportamentais que aqueles regulados pela administração do NPS.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo avaliar a relação entre o sistema adenosinérgico e o neuropeptídeo S no comportamento locomotor de camundongos.

Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com cafeína 3 mg/kg (dose inativa) no efeito hiperlocomotor de camundongos injetados intracerebroventricular com NPS na dose de 0,1 nmol (dose ativa);
- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com antagonistas adenosinérgicos CPT ou ZM241385, no efeito hiperlocomotor de camundongos induzido pela injeção intracerebroventricular de NPS na dose de 0,1 nmol;

3. ARTIGO

Artigo 01 (Neuropharmacology)

Adenosine A₁ and A_{2A} receptors modulate in opposite directions Neuropeptide S-induced hyperlocomotion in mice

Running title: Adenosine mediates effects of neuropeptide S

Caroline Martinello^a, Adalberto A. de Castro^a, Morgana Moretti^a, Tiago dos Santos

Casagrande^a, Remo Guerrini^b, Girolamo Calo^c, Elaine C. Gavioli^{a,d}, Carina R.

Boeck^a

^aLaboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil;

^bDepartment of Pharmaceutical Sciences, and Biotechnology Center, University of Ferrara, Italy;

^cDepartment of Experimental and Clinical Medicine, Section of Pharmacology and National Institute of Neuroscience, University of Ferrara, Italy;

^dDepartamento de Biofísica e Farmacologia, Centro de Biociências, Campus Universitário, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

Key words: neuropeptide S; locomotor activity; caffeine; adenosine A₁ receptors; adenosine A_{2A} receptors.

Corresponding author:

Elaine C. Gavioli, MSc, PhD.
Dept. de Biofísica e Farmacologia, Centro de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
Campus Universitário, 59072-970, Natal, RN, Brazil.
Phone: #55 84 3215 3419
E-mail: egavioli@ufrnet.br

Carina R. Boeck, MSc, PhD.
Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Av. Universitária, 1105, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil
Phone: #55 48 3443 4818
E-mail: bcr@unesc.net

Summary

Neuropeptide S (NPS) was identified as the endogenous ligand of a G-protein coupled receptor, named as the NPSR. Some behavioral effects have been recently attributed to NPS such as hyperlocomotion, anxiolysis, and wakefulness. However, little is known about the mechanisms by which NPS evokes such biological effects. In this context, the present study aimed to investigate the role played by the adenosinergic system in the hyperlocomotion induced by NPS. Naïve mice were treated acutely with caffeine, a non selective adenosine receptor, and highly selective adenosine A₁ (CPT) and A_{2A} (ZM241385) receptor antagonists before NPS (0.1 nmol, i.c.v.) challenge, afterwards mouse spontaneous locomotion was assessed in an activity cage for 30 min. Our findings revealed that the pretreatment with an inactive dose of caffeine (3 mg/kg, i.p.) prevented the increase in locomotion induced by NPS in mice during all period of observation. The co-administration of CPT, in an inactive dose (0.1 pmol, ic.v.), potentiates hyperlocomotion evoked by NPS only at the first 5 min of observation. In contrast, ZM241385 (0.1 pmol, i.c.v.), which increased spontaneous locomotion *per se*, attenuated hyperlocomotor effects of NPS. In summary, pharmacological blockade of A₁ receptors facilitates NPS-induced hyperlocomotion, while the antagonism of A_{2A} receptors significantly attenuated the stimulatory effects of NPS on locomotion. Altogether, this is the first evidence of a putative role played by the adenosinergic system in modulating hyperlocomotion induced by NPS.

Introduction

Neuropeptide S (NPS), a recently identified 20 amino acid peptide expressed in the mammalian brain, binds to a G-protein coupled receptor named NPSR (Xu et al., 2004). In cells expressing the recombinant NPS receptor, NPS increases Ca^{2+} mobilization, intracellular cAMP formation and phosphorylation of extracellular signal regulated-kinase (ERK1/2) (Xu et al., 2004; Reinscheid et al., 2005).

NPSR is widely expressed throughout the brain with high levels in the cerebral cortex, thalamus, hypothalamus and amygdala (Xu et al., 2007), while the NPS peptide precursor mRNA is strongly expressed in a cluster of neurons located between the locus coeruleus and the Barrington's nucleus (Xu et al., 2004). The neuroanatomical expression of NPS and its receptor NPSR supports the role played by this peptidergic system in physiological functions such as anxiety (Xu et al., 2004; Rizzi et al., 2008; Leonard et al., 2008; Vitale et al., 2008; Jungling et al., 2008; Meis et al., 2008), arousal (Xu et al., 2004; Rizzi et al., 2008), food intake (Beck et al., 2005; Smith et al., 2006), locomotion (Xu et al., 2004; Smith et al., 2006; Roth et al., 2006; Leonard et al., 2008; Rizzi et al., 2008; Okamura et al., 2008; Castro et al., 2009; Guerrini et al., 2009).

Caffeine is a psychoactive substance present in several beverages and foods, which is able to induce stimulatory effects such as vigilance, attention, and arousal (for a review see: Fisone et al., 2004). These behavioral effects of caffeine were attributed to its ability of competitively antagonizing, in a non selective manner, adenosine A_1 and A_{2A} receptors (Fisone et al., 2004). Adenosine is an endogenous purine nucleoside that is generated extra and intracellularly as a product of the breakdown of adenine nucleotides, such as ATP, due to an enzymatic reactions (for a review see: Xie et al., 2007). Adenosine binds, under physiological conditions, with

high affinity to A_1 and A_{2A} receptors, and with lower affinity to A_{2B} and A_3 receptors. The different adenosine receptor subtypes (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , and A_3) are all seven transmembrane spanning G-protein coupled receptors. The activation of A_1 and A_3 receptors inhibits adenylyl cyclase via $G_{i/o}$ proteins, decreasing intracellular cAMP levels; by contrast, the activation of A_{2A} and A_{2B} receptors increases cAMP formation via $G_{s/olf}$ proteins (Fisone et al., 2004). Due to the ability of caffeine to antagonize physiologically relevant adenosine subtype receptors, this molecule has been widely employed as a useful pharmacological tool to investigate the role played by adenosinergic system in physiological conditions.

It should be mention that adenosine influences synapses activity in a harmonic way, thus controlling neuronal communication through a fine-tuning modulatory fashion. Adenosine effects mediated through adenosine receptors could facilitate or counteract the receptor activation for neuropeptides such as calcitonin-gene related peptide (CGRP) and vasoactive intestinal peptide (VIP), and other several neurotransmitter receptors such as nicotinic, NMDA, and metabotropic glutamate receptors, as well as its own adenosine receptors (Sebastiao and Ribeiro, 2000).

It has been already suggested that NPS evokes similar effects to caffeine in mouse locomotion (Rizzi et al., 2008). Additionally, the parallel between caffeine and NPS can be extended to the regulation of wakefulness states (Xu et al., 2004; Rizzi et al., 2008), and food intake as several studies demonstrated that NPS evokes anorectic effects in rats (Beck et al., 2005; Smith et al., 2006) and chicks (Cline et al., 2007; Cline et al., 2008). In addition, a possible interaction between the adenosinergic and NPS - NPSR receptor systems has been proposed based on PCR studies that showed alterations in expression of mRNA NPS and its receptor in the rat hypothalamus and brainstem after acute and repeated caffeine treatments (Lage

et al., 2006). In this context, the present study aimed to investigate the involvement of adenosinergic system in the hyperlocomotor effect of NPS in mice. Naïve mice were treated acutely with caffeine, and highly selective adenosine A₁ (CPT) and A_{2A} (ZM241385) receptor antagonists before NPS challenge, afterwards mouse spontaneous locomotion was assessed in an infrared beam array activity cage for 30 min.

Materials and methods

Animals

Male CF-1 mice (2-3 months, 30-35 g) were obtained from our breeding colony (UNESC). The animals were housed six to cage with food and water available *ad libitum* and were maintained on a 12-h light/ dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). Each animal was used only once. All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the National Institute of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care, designed to minimize suffering and limit the number of animal used. Animals were used only once and to avoid the circadian variations all experiments were performed at the same time during the day, between 1:00 and 4:00 p.m. This study was approved by the local ethics committee (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense, protocol n. 625/07).

Drugs

The NPS was synthesized by Dr R. Guerrini, Department of Pharmaceutical Science and Biotechnology Center, University of Ferrara, according to published

methods (Roth et al., 2006). Caffeine, a non selective A_1 and A_{2A} receptor antagonist, and CPT, a selective A_1 receptor antagonist, were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), while ZM241385, a selective A_{2A} receptor antagonist, was purchased from Tocris Cookson Ltd. (Bristol, U.K.). ZM241385 stock solutions were prepared in DMSO and stored at -4°C (ZM241385 use solution at 0.02% DMSO). NPS and CPT stock solutions were prepared in saline solution (NaCl 0.9 g%, w/v) and were stored at -20°C . Caffeine and all others were diluted to the desired concentrations in saline solution just prior to use.

Treatments

NPS (1, 0.1 and 0.01 nmol), CPT (0.1 pmol), ZM241385 (0.1 pmol) and vehicle (saline solution) were injected intracerebroventricularly (i.c.v.), 5 min before testing. Caffeine (3 mg/kg) was injected intraperitoneally, in a volume of 10 mL/kg, 15 min before behavioral test (10 min before NPS injection). The dose of caffeine used in the present study (i.e. 3 mg/kg) was chosen based on previous study that showed to be *per se* inactive in the locomotor activity (Kuzmin et al., 2006). Alternatively, in a set of experiments, mice received NPS (0.1 nmol) or vehicle into the lateral ventricle in a constant volume of 2 μL , 5 min before behavioral testing. In other animals were given a combined i.c.v. injection of NPS (0.1 nmol; 1 μL) plus vehicle (1 μL), CPT (0.1 pmol; 100 nM; 1 μL) or ZM241385 (0.1 pmol; 100 nM; 1 μL) 5 min before behavioral testing. The doses of CPT and ZM241385 employed in the present study were selected based on previous studies (Boeck et al., 2004; El Yacoubi et al., 2000). All i.c.v. injections were carried out using the 'free hand' technique proposed by Laursen and Belknap (1986) and previously adopted in our studies (Castro et al., 2009). Briefly, under light ether anesthesia (just sufficient for loosing the righting

reflex), a 27-gauge needle attached to a 10 μ L Hamilton syringe was inserted perpendicularly 3 mm deep through the skull, into the left ventricle, at a position 2 mm lateral from the midline on the line drawn through the anterior base of the ears. Five min after i.c.v. injection, mice were evaluated in the infrared beam array cage. For control animal i.c.v. and i.p. injections of saline solution, at the same volume for drugs were adopted. At the end of the experiments, each mouse was decapitated and whether its brain showed cannula misplacement or any signs of cerebral haemorrhage the mouse were excluded from the statistical analysis (less than 5% of the animals overall).

Locomotor activity assay

An infrared beam array cage (Insight Equipments, Ribeirão Preto, Brazil) connected to a PC was used for assessing locomotor activity in mice. The infrared beam array cage consists of a cubicle made of clear Perspex (48 x 50 cm) surrounded by 50 cm-high walls. Two facing blocks containing an infrared array record the horizontal activity, and a similar system assesses the vertical activity. Non-habituated animals were gently placed on the centre of the arena and they were allowed to explore the apparatus individually during a period of 30 min. All behavioral experiments were conducted in an illuminated (300 lx) and quiet room. After the behavioral evaluation of each mouse, the arena was cleaned with 10% ethanol solution. Each mouse was evaluated for the first time to locomotor activity, individually during a 30-min period. The total distance travelled (in centimeters) by each animal was accumulated over consecutive 5 min time. Additionally, the frequency of rearings and the immobility time (in seconds) spent in the activity cage were recorded during 30 min.

Statistical Analysis

All data presented are expressed as the mean \pm S.E.M, and each value reflects the mean of 11 to 13 animals per group. The means were compared by a one-way analysis of variance (ANOVA) and one-way ANOVA with repeated measures, as required, followed by Tukey's post-hoc test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Results were analyzed by Statistic® software version 6.0.

Results

Naïve CF-1 mice i.c.v. injected with vehicle displayed a spontaneous small reduction of locomotor activity over the 30 min of observation (figure 1). The i.c.v. administration of NPS at doses of 0.1 nmol/mouse, but not 0.01 or 1 nmol, increased spontaneous locomotion compared to control up to 20 min of observation (figure 1A). Figure 1B illustrates a significant increase in the cumulative distance traveled during 30 min of observation in mice treated with NPS 0.1 nmol compared to control group ($P < 0.05$). The stimulatory effect of NPS was bell shaped, since the i.c.v. injection of NPS at 0.1 nmol produced a higher stimulatory effect compared to the 1 nmol dose.

The i.p. injection of caffeine at 3 mg/kg did not alter cumulative distance traveled by mice during 30 min of observation compared to control group (figure 2, right panel). In this series of experiments, NPS 0.1 nmol increased the spontaneous locomotion up to 15 min compared to saline-treated mice. However, the i.p. pretreatment with caffeine prevented the hyperlocomotion induced by NPS in mice, as displayed in figure 2 (left panel; $P < 0.05$) the locomotor activity over the time course of the experiment.

Table 1 showed that the treatment with NPS 0.1 nmol increased the number of rearings compared to control. Caffeine 3 mg/kg did not affect this behavioral parameter recorded during 30 min. However, the pretreatment with caffeine prevented the increase in the frequency of rearings observed in NPS-treated mice ($P < 0.05$). Alteration in immobility time was also recorded during this series of experiments. In fact, the i.c.v. injection of NPS 0.1 nmol reduced the immobility time compared to control, while the pretreatment with caffeine (which was inactive *per se*), prevented the reduction of immobility time induced by NPS in mice ($P < 0.05$; Table 1).

Figure 3 showed that the administration of CPT 0.1 pmol did not alter spontaneous distance traveled in mice. In the same experimental set, NPS 0.1 nmol increased non-habituated animal locomotion up to 20 min of observation (figure 3A). The co-administration of CPT and NPS increased the distance traveled only at the first 5 min of observation compared to the treatment of NPS alone ($P < 0.05$; figure 3A). Regarding the number of rearings, the treatment with NPS alone, but not CPT, increased number of rearing compared to control. However, the co-administration of NPS plus CPT caused an increment in the number of rearing compared to control, but not statistically different from NPS-treated mice ($P < 0.05$; table 1). Additionally, similar to NPS, the administration of CPT reduced immobility time compared to control ($P < 0.05$). The co-administration of NPS and CPT further reduced immobility time compared to NPS alone ($P < 0.05$; table 1).

As illustrated in figure 4, the i.c.v. injection of ZM241385 0.1 pmol caused an increase in the distance traveled by mice compared to control ($P < 0.05$). The increase in spontaneous locomotion evoked by NPS was reduced in mice co-treated with ZM241385 when compared to NPS treatment *per se* (figure 5; $P < 0.05$). As described in table 1, NPS increased the frequency of rearings during 30 min of observation.

The administration of ZM241385 did not modify this parameter *per se*, but blocked the stimulatory effect of NPS ($P < 0.05$; table 1). Additionally, the administration of NPS and ZM241385 reduced the time that mice spent immobile in the activity cage compared to control ($P < 0.05$; table 1). However, the co-administration of NPS plus ZM241385 did not attenuate the reduction of immobility time evoked by NPS alone (table 1).

Discussion

In the present study, we used the combination of NPS and caffeine, a non selective adenosine A_1 and A_{2A} receptor antagonist, and two selective adenosine A_1 and A_{2A} receptor antagonists, CPT and ZM241385 respectively, to investigate the participation of the adenosinergic system in the hyperlocomotor effect of NPS. In non-habituated mice, the i.c.v. injection of NPS 0.1 nmol increased substantially the spontaneous locomotion up to 15-20 min of observation. Thus, the present data are in line with previous findings that showed robust and consistent hyperlocomotor effects of NPS in rodents (Roth et al. 2006; Smith et al., 2006; Leonard et al., 2008; Rizzi et al., 2008; Castro et al., 2009).

Recently, with the development of selective NPSR antagonists, two distinct research groups demonstrated that the stimulatory effects of NPS are mediated by the activation of NPSR receptors. In fact, Okamura et al. (2008) have shown that the peripheral administration of the non peptide NPSR receptor antagonist SHA 68 antagonized NPS-induced increase in horizontal and vertical locomotor activity. In addition, Guerrini et al. (2009) demonstrated that the peptide NPSR receptor antagonist [D-Val⁵]NPS was able to block hyperlocomotor effects of NPS.

NPS has been described as a new peptidergic neurotransmitter involved in the modulation of locomotion, wakefulness, food intake and anxiety. Similar hyperlocomotor, arousal promoting and anorectic effects could be observed in response to both caffeine and NPS administration in rodents. On the contrary, opposite actions are described on anxiety states in mice (Xu et al., 2004; Rizzi et al., 2008) and rats (Vitale et al., 2008), with NPS producing anxiolytic-like and caffeine anxiogenic-like effects (El Yacoubi et al., 2000). Caffeine is a non-selective antagonist of adenosine receptors that evokes arousal effects, hyperlocomotion, and anorectic effects beyond homeostatic function in the brain (for a review see: Fredholm et al., 2005). Herein, the pretreatment with caffeine, in an inactive dose (i.e. 3 mg/kg), prevented the increase in locomotion induced by NPS in mice during all period of observation. In the same way, caffeine also prevented the increase in rearing behavior and the reduction of immobility time induced by NPS. These findings suggest that the hyperlocomotor effect of NPS could be, in part, mediated by the adenosinergic system.

Considering the lack of selectivity of caffeine in antagonizing adenosine receptors, in the present study an A_1 and an A_{2A} selective receptor antagonist were employed in order to investigate the role played by both adenosine receptors in the stimulatory effects of NPS. We observed that CPT, a selectively A_1 receptor antagonist, potentiated the hyperlocomotion evoked by NPS only up to the first 5 min of observation. Additionally, the co-injection of CPT and NPS further decreased the cumulative immobility time (recorded for 30 min) compared to NPS treated mice. Interestingly, the i.c.v. administration of CPT *per se* did not alter locomotor activity in mice, such as previously reported (Boeck et al., 2004). In contrast to what observed for A_1 receptor antagonist, the administration of ZM241385 increases *per se*

locomotion in naïve mice, such as reported previously to other A_{2A} receptor antagonists (Svenningsson et al., 1997; Karcz-Kubicha et al., 2003; Antoniou et al., 2005). However, the administration of ZM241385 significantly counteracted the hyperlocomotor effect of NPS, which was particularly noted during the period between 10 and 20 min of observation. In agreement with locomotion, ZM241385 also prevented the increase in rearing behavior induced by NPS. Our data suggest that A_1 and A_{2A} receptors play opposite effects on NPS-induced hyperlocomotion; i.e. A_1 receptor signaling appears to attenuate, while A_{2A} receptor activation potentiates stimulatory effects of NPS. Taken together these findings suggest that the stimulatory effects of NPS are under tight control of endogenous adenosine, thus the activation of A_1 receptors appears to counteract, while the action on A_{2A} receptors facilitates NPS actions.

It should be mentioned that adenosine modulates, in a similar fashion to NPS, the effect of other neuropeptides, such as vasoactive intestinal peptide (VIP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) (for a review see: Sebastiao e Ribeiro, 2000). In fact, the tonic activation of A_{2A} receptors facilitates CGRP action in neuromuscular junction (Correia-de-Sa and Ribeiro, 1994; Carruthers et al., 2001) and in hippocampus (Sebastião et al., 2000), while A_1 receptors counteracted the CGRP actions at motor nerve terminals (Correia-de-Sa and Ribeiro, 1994). Interestingly enough, VIP and CGRP receptors, as well as NPSR receptor, are positively coupled to adenylate cyclase. These observations strength the view of a common neural pathway shared by NPS and adenosine systems.

Although we employed the i.c.v. route of administration which does not allow a detailed investigation of the brain site responsible for a given effect, the brain areas possibly relevant to the stimulant action of NPS are worth mentioning. A recent

detailed study demonstrated that NPSR receptor is expressed in brain areas mediating arousal, including the thalamus, hypothalamus, ventral tuberomammillary nucleus, substantia nigra, ventral tegmental area, pontine reticular nucleus, and also the motor cortex neurons (Xu et al., 2007). Concerning adenosinergic system, both A_1 and A_{2A} receptors are expressed in the striatal area; however, the A_1 receptors are present in lower density in the basal ganglia, mostly presynaptically (Rivkees et al., 1995), exerting inhibitory control of neurotransmitters release, such as dopamine, glutamate, and acetylcholine (Sebastiao and Ribeiro, 2000). The A_{2A} receptors are highly expressed in dopamine containing fibers, such as striatum and olfactory tubercle (Jarvis and Williams, 1989). In the striatum, A_{2A} receptors are particularly postsynaptically located (Fink et al., 1992). These dopaminergic neurons exert a critical modulatory role in the functioning of the basal ganglia.

It is well debated the role played by adenosinergic system in the modulation of voluntary movements; particularly by modulating dopaminergic signaling in the striatum. In fact, A_1 receptors appear to inhibit dopamine release in this brain area (Okada et al., 1996). By contrast, adenosine by acting in A_{2A} receptors counteracts intracellularly dopamine signaling on striatal neurons (for a review see: Xie et al., 2007). Thus, considering the cross-talk between dopamine and adenosine systems in modulating the excitatory glutamatergic input in the striatum, we could not rule out a possible interrelation between adenosine, NPS and dopamine systems. This view could be supported by the fact that NPSR receptors are expressed in the substantia nigra pars compacta (Xu et al, 2007), which is an important site of dopamine synthesis.

In conclusion, the present study illustrates for the first time a modulatory tone exerted by endogenous adenosine in the hyperlocomotion evoked by NPS. Our

findings showed that the pharmacological blockade of A₁ receptors by CPT facilitates NPS-induced hyperlocomotion, while the antagonism of A_{2A} receptors by ZM241385 significantly attenuated the stimulatory effects of NPS on locomotion. This modulatory action of adenosine under NPS effects could be due to a common pathway shared by both systems. However, a possible cross-talk between adenosine, NPS and dopamine in the mediation of motor behavior should be considered, since NPSR receptor is expressed in dopaminergic neurons from the substantia nigra pars compacta, an important site of dopamine synthesis. Altogether, the modulatory actions of endogenous adenosine under the NPS effects contribute, in part, to explain the mechanisms by which NPS induces stimulatory actions in rodents. Further studies using knockout mice and NPSR antagonists could provide additional information about the interaction between adenosine and NPS systems. Microinjection and neurochemical techniques are also now needed to identify the brain areas in which the interaction between adenosine and NPS systems takes place.

Acknowledgments

This work was supported by funds from International Brain Research Organization-IBRO (Return Home Fellowship to ECG), the Brazilian National Council Research (CNPq grants, n° 478249/2006-3 to CRB and 479760/2007 to ECG) and UNESC.

References

- Antoniou, K., Papadopoulou-Daifoti, Z., Hyphantis, T., Papathanasiou, G., Bekris, E., Marselos, M., Panlilio, L., Müller, C.E., Goldberg, S.R., Ferré, S., 2005. A detailed behavioral analysis of the acute motor effects of caffeine in the rat: involvement of adenosine A₁ and A_{2A} receptors. *Psychopharmacology* 183, 154–62.
- Beck, B., Fernet, B., Stricker-Krongrad, A., 2005. Peptide S is a novel potent inhibitor of voluntary and fast-induced food intake in rats. *Biochemical and biophysical research communications* 332, 859-65.
- Boeck, C.R., Ganzella, M., Lottermann, A., Vendite, D., 2004. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia* 45(7), 745-50.
- Carruthers, A.M., Sellers, L.A., Jenkins, D.W., Jarvie, E.M., Feniuk, W., Humphrey, P.P., 2001. Adenosine A(1) receptor-mediated inhibition of protein kinase A-induced calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal neurons. *Molecular Pharmacology* 59, 1533–41.
- Castro, A.A., Moretti, M., Casagrande, T.S., Martinello, C., Petronilho, F., Streckert, A.V., Guerrini, R., Calo', G., Dal Pizzol, E., Quevedo, J., Gavioli, E.C., 2009. Neuropeptide S produces hyperlocomotion and prevents oxidative stress damage in the mouse brain: A comparative study with amphetamine and diazepam. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, in press, doi:10.1016/j.pbb.2008.10.015.
- Cline, M.A., Godlove, D.C., Nandar, W., Bowden, C.N., Prall, B.C., 2007. Anorexigenic effects of central neuropeptide S involve the hypothalamus in chicks (*Gallus gallus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 148(3), 657-63.
- Cline, M.A., Prall, B.C., Smith, M.L., Calchary, W.A., Siegel, P.B., 2008. Differential appetite-related responses to central neuropeptide S in lines of chickens divergently selected for low or high body weight. *J Neuroendocrinology* 20(7), 904-8.
- Correia-de-Sa, P., Ribeiro, J.A., 1994. Potentiation by tonic A_{2a}-adenosine receptor activation of CGRP-facilitated: [3H]-ACh release from rat motor nerve endings. *British Journal of Pharmacology* 111, 582–88.
- El Yacoubi, M., Ledent, C., Parmentier, M., Costentin, J., Vaugeois, J.M., 2000. The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A(2A) adenosine receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 148(2), 153-63.
- El Yacoubi, M., Ledent, C., Parmentier, M., Costentin, J., Vaugeois, J., 2000. SCH 58261 and ZM 241385 differentially prevent the motor effects of CGS 21680 in mice: evidence for a functional 'atypical' adenosine A(2A) receptor. *European Journal of Pharmacology* 401(1), 63-77.
- Fink, J.S., Weaver, D.R., Rivkees, S.A., Peterfreund, R.A., Pollack, A.E., Adler, E.M., Reppert, S.M., 1992. Molecular cloning of the rat A₂ adenosine receptor: selective co-expression with D₂ dopamine receptors in rat striatum. *Brain Research. Molecular Brain Research* 14,186-95.
- Fisone, G., Borgkvist, A., Usiello, A., 2004. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 857-72.
- Fredholm, B.B., Chen, J-F., Cunha, R.A., Svenningsson, P., Vaugeois, J-M., 2005. Adenosine and brain function. *International Review of Neurobiology* 63, 191-270.

- Guerrini, R., Camarda, V., Trapella, C., Calo, G., Rizzi, A., Ruzza, C., Fiorini, S., Marzola, E., Reinscheid, R., Regoli, D., Salvadori, S., 2009. Synthesis and biological activity of human neuropeptide S analogues modified in position 5: identification of potent and pure NPS receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, *in press*, doi: 10.1021/jm8012294.
- Jarvis, M.F., Williams, M., 1989. Direct autoradiographic localization of adenosine A₂ receptors in the rat brain using the A₂-selective agonist, [3H]CGS 21680. *European Journal of Pharmacology* 168(2), 243-6.
- Jüngling, K., Seidenbecher, T., Sosulina, L., Lesting, J., Sangha, S., Clark, S.D., Okamura, N., Duangdao, D.M., Xu, Y.L., Reinscheid, R.K., Pape, H.C., 2008. Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron* 59(2), 298-310.
- Karcz-Kubicha, M., Antoniou, K., Terasmaa, A., Quarta, D., Solinas, M., Justinova, Z., Pezzola, A., Reggio, R., Muller, C.E., Fuxe, K., Goldberg, S.R., Popoli, P., Ferre, S., 2003. Involvement of adenosine A₁ and A_{2A} receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. *Neuropsychopharmacology* 28, 1281-91.
- Kuzmin, A., Johansson, B., Gimenez, L., Ögren, S-O., Fredholm, B.B., 2006. Combination of adenosine A₁ and A_{2A} receptor blocking agents induces caffeine-like locomotor stimulation in mice. *European Neuropsychopharmacology* 16, 129-36.
- Lage, R., Dieguez, C., Lopez, M., 2006. Caffeine treatment regulates neuropeptide S system expression in the rat brain. *Neuroscience Letters* 410, 47-51.
- Laursen, S.E., Belknap, J.K., 1986. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *Journal of Pharmacological Methods* 16, 355-57.
- Leonard, S.K., Dwyer, J.M., Sukoff Rizzo, S.J., Platt, B., Logue, S.F., Neal, S.J., Malberg, J.E., Beyer, C.E., Schechter, L.E., Rosenzweig-Lipson, S., Ring, R.H., 2008. Pharmacology of neuropeptide S in mice: therapeutic relevance to anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 197, 601-11.
- Meis, S., Bergado-Acosta, J.R., Yanagawa, Y., Obata, K., Stork, O., Munsch, T., 2008. Identification of a neuropeptide S responsive circuitry shaping amygdala activity via the endopiriform nucleus. *PLoS ONE* 3(7), e2695.
- Okada, M., Mizuno, K., Kaneko, S., 1996. Adenosine A₁ and A₂ receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neuroscience Letters* 212, 53-6.
- Okamura, N., Habay, S.A., Zeng, J., Chamberlin, A.R., Reinscheid, R.K., 2008. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo profile of 3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (SHA 68), a selective antagonist of the neuropeptide S receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 325, 893-901.
- Reinscheid, R.K., Xu, Y.L., Okamura, N., Zeng, J., Chung, S., Pai, R., Wang, Z., Civelli, O., 2005. Pharmacological characterization of human and murine neuropeptide s receptor variants. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315, 1338-1345.
- Rivkees, S.A., Price, S.L., Zhou, F.C., 1995. Immunohistochemical detection of A₁ adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Research* 677, 193-203.
- Rizzi, A., Vergura, R., Marzola, G., Ruzza, C., Guerrini, R., Salvadori, S., Regoli, D., Calo, G., 2008. Neuropeptide S is a stimulatory anxiolytic agent: a behavioural study in mice. *British Journal of Pharmacology* 154, 471-9.

- Roth, A.L., Marzola, E., Rizzi, A., Arduin, M., Trapella, C., Corti, C., Vergura, R., Martinelli, P., Salvadori, S., Regoli, D., Corsi, M., Cavanni, P., Calo', G., Guerrini, R., 2006. Structure–activity studies on neuropeptide S: identification of the amino acid residues crucial for receptor activation. *Journal of Biological Chemistry* 281, 20809–16.
- Sebastião, A.M., Ribeiro, J.A., 2000. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends in Pharmacological Science* 21(9),341-6.
- Sebastião, A.M., Macedo, M.P., Ribeiro, J.A., 2000. Tonic activation of A(2A) adenosine receptors unmasks, and of A(1) receptors prevents, a facilitatory action of calcitonin gene–related peptide in the rat hippocampus. *British Journal of Pharmacology* 129, 374–80.
- Smith, K.L., Patterson, M., Dhillon, W.S., Patel, S.R., Semjonous, N.M., Gardiner, J.V., Ghatgei, M.A., Bloom, S.R., 2006. Neuropeptide S stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibits food intake. *Endocrinology* 147, 3510-8.
- Svenningsson, P., Le Moine, C., Fisone, G., Fredholm, B.B., 1999. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors. *Progress in Neurobiology* 59, 355-96.
- Svenningsson, P., Nomikos, G.G., Ongini, E., Fredholm, B.B., 1997. Antagonism of adenosine A_{2A} receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience* 79, 753-64.
- Smith, K.L., Patterson, M., Dhillon, W.S., Patel, S.R., Semjonous, N.M., Gardiner, J.V., Ghatgei, M.A., Bloom, S.R., 2006. Neuropeptide S Stimulates the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis and Inhibits Food Intake. *Endocrinology* 147(7), 3510–8.
- Vitale, G., Filaferro, M., Ruggieri, V., Pennella, S., Frigeri, C., Rizzi, A., Guerrini, R., Calo, G., 2008. Anxiolytic-like effect of neuropeptide S in the rat defensive burying. *Peptides* 29, 2286-91.
- Xie, X., Ramkumar, V., Toth, L.A., 2007. Adenosine and dopamine receptor interactions in striatum and caffeine-induced behavioral activation. *Comparative Medicine* 57(6), 538-45.
- Xu, Y.L., Reinscheid, R.K., Huitron-Resendiz, S., Clark, S.D., Wang, Z., Lin, S.H., Brucher, F.A., Zeng, J., Ly, N.K., Henriksen, S.J., de Lecea, L.; Civelli, O., 2004. Neuropeptide S: a neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* 43, 487–97.
- Xu, Y.L., Gall, C.M., Jackson, V.R., Civelli, O., Reinscheid, R.K., 2007. Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* 500, 84–102.

Legends

Figure 1 – Effects of the i.c.v. injection of neuropeptide S (0.01, 0.1 and 1 nmol; NPS) on the spontaneous locomotor activity assessed in infrared beam array cages in mice for 30 min. Data are shown as mean \pm S.E.M. (11-13 mice/group). * $P < 0.05$ vs. control group according to one-way ANOVA with repeated measures followed by the Tukey test.

Figure 2 - Effects of the pretreatment with caffeine (3 mg/kg, i.p.), a non selective adenosine receptor antagonist, 15 min before the administration of NPS 0.1 nmol (i.c.v.) on the spontaneous locomotor activity assessed in infrared beam array cages in mice for 30 min. Data are shown as mean \pm S.E.M. (11-13 mice/group). * $P < 0.05$ vs. control group, and # $P < 0.05$ vs. NPS 0.1 nmol according to one-way ANOVA with repeated measures followed by the Tukey test.

Figure 3 - Effects of the i.c.v. co-administration of CPT 0.1 pmol, a selective A_1 receptor antagonist, and NPS 0.1 nmol on the spontaneous locomotor activity assessed in infrared beam array cages in mice for 30 min. Data are shown as mean \pm S.E.M. (11-13 mice/group). * $P < 0.05$ vs. control group and # $P < 0.05$ vs. NPS 0.1 nmol according to one-way ANOVA with repeated measures followed by the Tukey test.

Figure 4 - Effects of the i.c.v. co-administration of ZM241385 0.1 pmol, a selective A_2A receptor antagonist, and NPS 0.1 nmol on the spontaneous locomotor activity assessed in infrared beam array cages in mice for 30 min. Data are shown as mean \pm S.E.M. (11-13 mice/group). * $P < 0.05$ vs. control group and # $P < 0.05$ vs. NPS 0.1 nmol according to one-way ANOVA with repeated measures followed by the Tukey test.

Figure 1

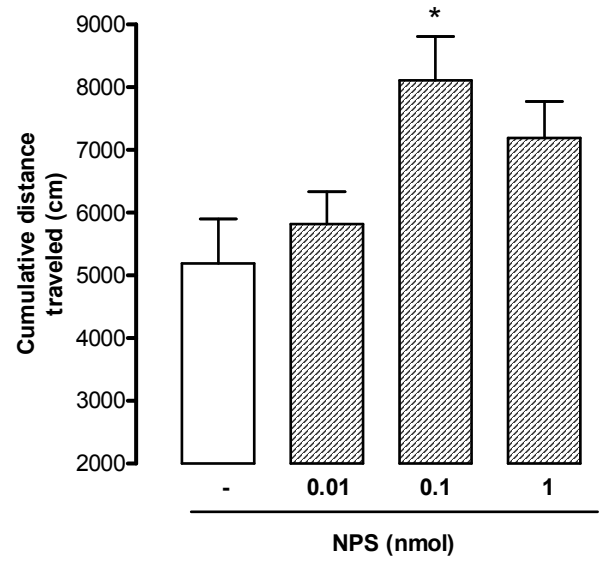
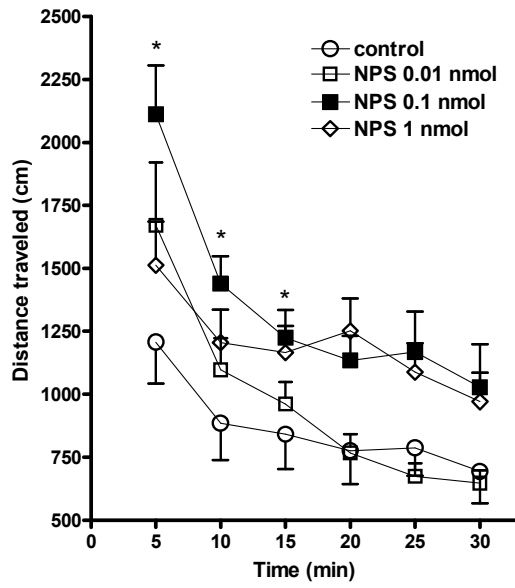


Figure 2

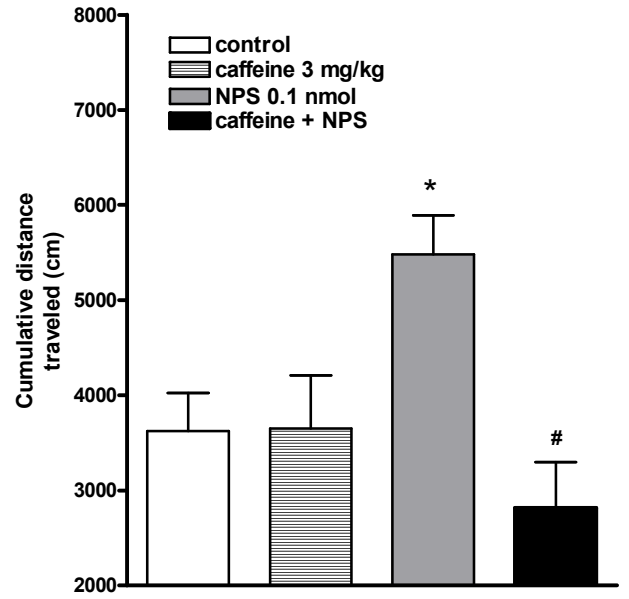
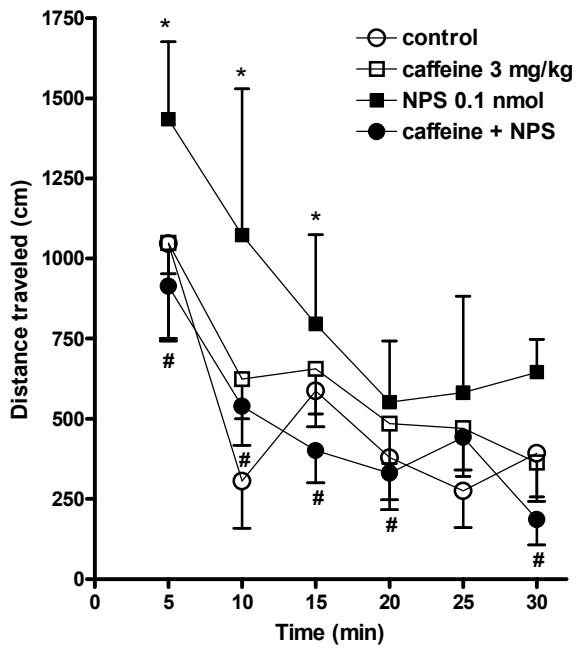


Figure 3

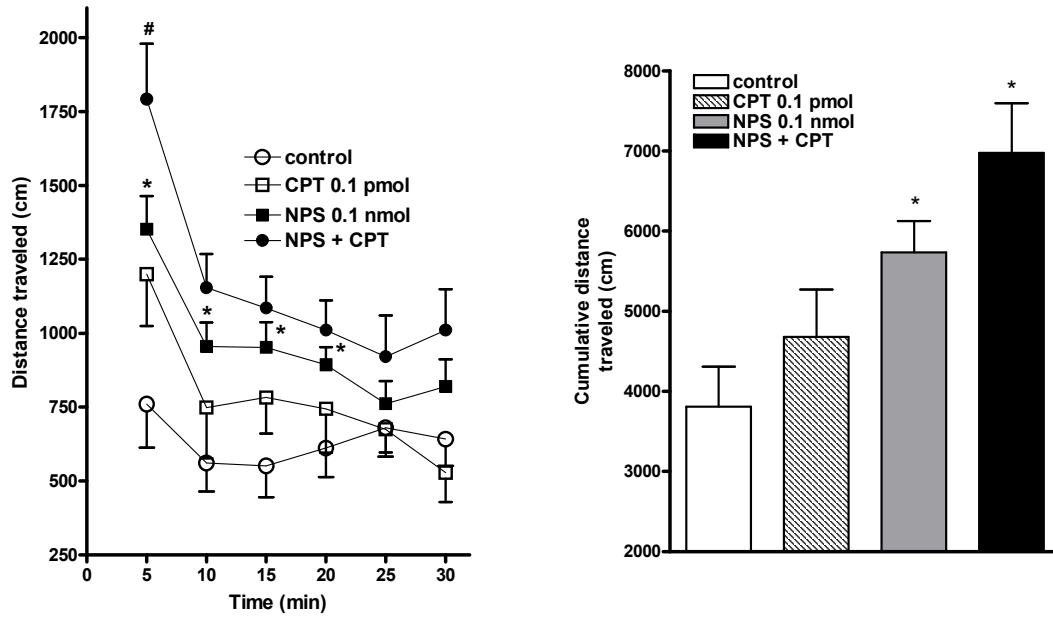


Figure 4

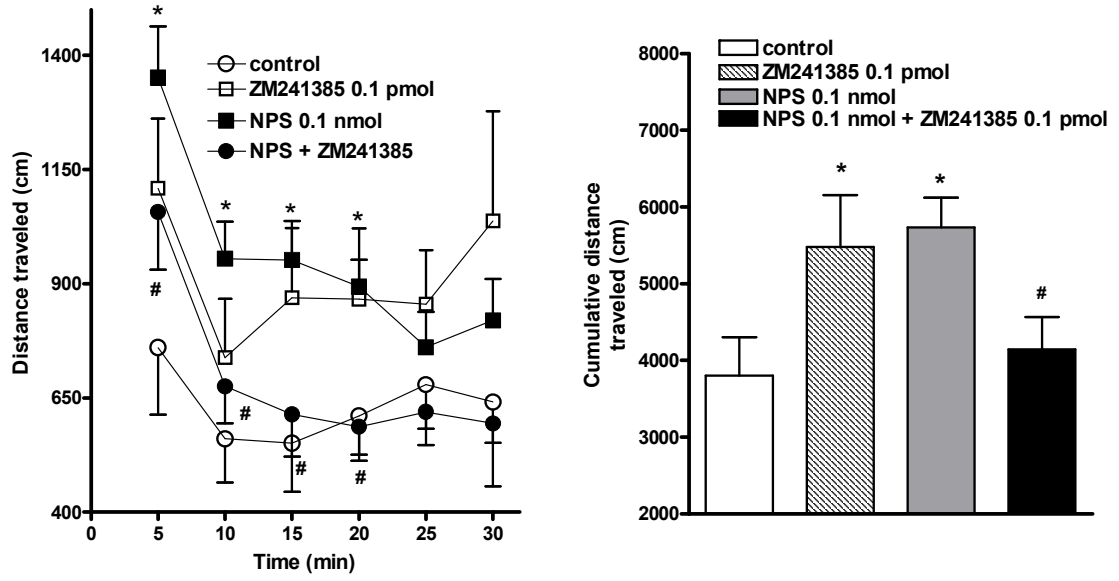


Table 1 – Effects of the i.c.v. injection of neuropeptide S (NPS 0.1 nmol) and adenosine A₁ and A_{2A} receptor antagonists (caffeine, a non selective adenosine antagonist; CPT, a selective A₁ receptor antagonist; ZM241385, a selective A_{2A} receptor antagonist) on number of rearings, and immobility time in mice assessed in infrared beam array cages during 30 min.

<i>Treatments</i>	Number of rearings	Immobility time (s)
<i>Control</i>	58.8 ± 12.0	281.1 ± 82.2
NPS 0.1 nmol	98.8 ± 10.5*	70.3 ± 28.0*
Caffeine 3 mg/kg	60.2 ± 14.9	241.9 ± 51.8
Caffeine + NPS	36.3 ± 9.2 [#]	347.2 ± 112.9 [#]
Control	66.3 ± 14.5	246.3 ± 96.7
CPT 0.1 pmol	89.3 ± 12.8	29.3 ± 13.9*
ZM241385 0.1 pmol	85.0 ± 10.5	45.2 ± 24.7*
NPS 0.1 nmol	110.5 ± 11.1*	25.8 ± 13.8*
CPT + NPS	127.1 ± 15.8*	0.0 ± 0.0 [#]
ZM241385 + NPS	73.3 ± 8.5 [#]	66.4 ± 27.9*

Data are shown as mean ± S.E.M. (11-13 mice/group). *P<0.05 vs. control group, and [#]P<0.05 vs. NPS 0.1 nmol according to one-way ANOVA followed by the Tukey test.

4. DISCUSSÃO

Pouco ainda se sabe sobre as vias intracelulares de atuação do NPS. Após a junção do neuropeptídeo NPS com seu receptor NPSR há uma ativação da proteína G e consequentemente da adenilato ciclase. Esta por sua vez estimula o influxo de cálcio e PKA. Estas são apenas parte de uma cascata de eventos que um neuropeptídeo pode fazer. Como o NPS vem evoluindo durante a evolução das espécies, é provável que esta cascata bioquímica de eventos intracelulares venha acompanhando esta evolução. Estas análises intracelulares de neurotransmissores e neuromoduladores específicos podem ser úteis para desvendar o desenvolvimento do cérebro e seu comportamento frente às novas funções evolucionárias, como é o caso do sono e da ansiedade; comportamentos ligados ao NPS (Reinscheid, 2007).

Todos os animais vertebrados passam por algum momento de descanso durante o dia seguido de períodos de intensa atividade cerebral, chamamos isso de ciclo sono/vigília. Da mesma forma, a maioria das espécies de vertebrados possui algum tipo de comportamento emocional, geralmente associado ao medo e a ansiedade, que conduzem a comportamentos defensivos que são de vital importância para a sobrevivência da espécie. Estes dois comportamentos complexos são encontrados em todos os vertebrados terrestres e coincidentemente são nessas espécies que encontramos o gene percussor do NPS (Reinscheid, 2007).

Os estudos atuais demonstram que o NPS modula o ciclo sono/vigília e a ansiedade, caracterizando-o como um comportamento completamente original para um neuromodulador. A maioria dos neurotransmissores ou drogas que influenciam no sono como a anfetamina e a cocaína promovem um estado de ansiedade e suprimem o sono. Já as drogas como o diazepam, que atua amenizando a ansiedade provoca intenso sono.

Hoje já se sabe que o NPS atua em outros eventos comportamentais e que possivelmente está ligado a outros neuromoduladores. Em 2006, Lage e colaboradores fizeram um estudo onde demonstraram que a cafeína pode alterar a expressão do RNAm do NPS em algumas regiões do cérebro. Foi comprovado que após duas horas da administração de cafeína houve uma diminuição significativa do RNAm do NPS no tronco cerebral de camundongos e aumento significativo do RNAm do NPSR no mesmo local. Este artigo sugere uma ligação entre a cafeína e o NPS. Além do que, algumas das atividades biológicas do NPS são extremamente iguais aos da cafeína como: aumento da atividade locomotora, diminuição do sono REM e NREM, diminuição da ingestão alimentar e aumento do tempo de vigília (Xu et al., 2004; Roth et al., 2006; Rizzi et al., 2008; Castro et al., 2009). Mais do que uma ligação com a cafeína, nosso estudo investigou uma associação com a adenosina, pois, a cafeína é um antagonista não seletivo da adenosina.

A adenosina desempenha um papel importante como neuromoduladora do SNC, influenciando muitas respostas comportamentais (Florio et al., 1997). Além de neuromoduladora do SNC ela também tem ação em outros neurotransmissores. Recentemente foi demonstrado que a adenosina, através da inibição de A_1 e excitação de A_{2A} é essencial para a vasoativação do peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Cunha-Reis et al., 2008). No cérebro a adenosina está presente nos processos fisiológicos e patológicos, incluindo regulação do sono, excitação, neuroproteção e epilepsias (Dunwiddie & Masino., 2001).

Assim, no presente estudo, utilizamos a combinação de cafeína ou antagonistas altamente seletivos dos receptores de adenosina com NPS, para avaliar a participação da adenosina na hiperlocomoção induzida por NPS. Nos camundongos não habituados, a injeção i.c.v. de NPS 0,1 nmol, aumentou a locomoção espontânea até os 15-20 minutos de observação na caixa de atividade locomotora. Isso confirma estudos anteriores, demonstrando que a curva de locomoção do NPS depende da relação entre animais habituados e a dose

utilizada (Roth et al., 2006; Rizzi et al., 2008). O NPS tem sido descrito como um sistema neuropeptidérgico envolvido no controle da vigília, ansiedade, ingestão alimentar e locomoção (Xu et al., 2004; Roth et al., 2006; Smith et al., 2006; review Reinscheid, 2008). Efeitos semelhantes também são encontrados na cafeína, que é uma substância estimulante, mas possui efeitos ansiogênicos quando administrado em doses mais elevadas (El Yacoubi et al., 2000; Prediger et al., 2004). A cafeína é um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina e seus efeitos no ciclo sono/vigília são bem conhecidos (Radulovacki, M., 1985; Marks et al., 2003), assim como na atividade locomotora (Karcz-Kubicha et al., 2003; Kuzmin et al., 2006). A cafeína em dose baixa (3mg/kg) impede o aumento da estimulação motora induzida por NPS (0,1nmol), em camundongos durante todo o período de observação e não tem nenhum efeito por si só. Os efeitos da cafeína são mediados através do antagonismo dos receptores adenosinérgicos A_1 e A_{2A} (Fisone et al., 2004). Enquanto os receptores A_{2A} desempenham um papel fundamental no comportamento locomotor mediado pela cafeína (El Yacoubi et al., 2000), CPT, um antagonista seletivo de A_1 , potencializou a hiperlocomoção induzida pelo NPS somente nos primeiros 5 minutos de observação, o que se contrapõe com os efeitos da cafeína. A administração i.p. de CPT em doses maiores que aqui usadas induz a hiperlocomoção em ratos (Karcz-Kubicha et al., 2003; Antoniou et al., 2005), no entanto, não observamos qualquer alteração no comportamento de camundongos tratados com doses baixas de CPT i.c.v., como relatado anteriormente (Boeck et al., 2004). Ao contrário, a administração de ZM, um antagonista seletivo de A_{2A} , induz a hiperlocomoção em camundongos não habituados, tal como relatado anteriormente com outros antagonistas de A_{2A} (Karcz-Kubicha et al., 2003; Antoniou et al., 2005; Svenningsson et al., 1997). Nossos dados sugerem que os receptores A_1 e A_{2A} desempenham efeitos opostos sobre a hiperlocomoção induzida pelo NPS, ou seja, o receptor A_1 atenua o efeito hiperlocomotor, enquanto que o receptor A_{2A} potencializa o efeito hiperlocomotor do NPS.

Sendo assim, sugerimos que os efeitos estimulatórios do NPS estão sob rigoroso controle da adenosina endógena. Lembrando que a adenosina modula, de forma semelhante outros neuropeptídeos, como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) (Sebastião e Ribeiro, 2000). Curiosamente, receptores VIP e CGRP, bem como receptores NPSR, estão ligados a adenilato ciclase. Estas observações fortalecem ainda mais a opinião de que há uma ligação comum entre a trajetória neural do NPS e da adenosina. Um estudo recente demonstrou que o receptor NPSR é expresso em áreas cerebrais excitatórias, incluindo o tálamo, hipotálamo, núcleo ventral tuberomamilar, substância negra e também neurônios do córtex motor (Xu et al., 2007). Quanto ao sistema adenosinérgico, tanto os receptores A_1 e A_{2A} , são expressos em áreas estriatais; porém, receptores A_1 , são encontrados em menor quantidade nos gânglios basais, na maioria pré-sinápticos (Rivkees et al., 1995), exercendo um controle inibitório na liberação de neurotransmissores, como a dopamina, o glutamato e a acetilcolina (Sebastião e Ribeiro, 2000). Já os receptores A_{2A} , são altamente expressos em regiões dopaminérgicas, tais como o estriado, tubérculo olfatório (Jarvis and Williams, 1989). No estriado, os receptores A_{2A} estão localizados em sua maioria nas pós-sinapses (Fink et al., 1992). Estes neurônios dopaminérgicos exercem um papel importante nos gânglios basais. O sistema adenosinérgico controla movimentos voluntários, através da modulação dopaminérgica no corpo estriado. Na verdade, os receptores A_1 parecem inibir a dopamina liberada nestas áreas cerebrais (Okada et al., 1996). Em contrapartida, os receptores A_{2A} estimulam a liberação dopaminérgica dos neurônios estriatais, fazendo um contrabalanço (Xie et al., 2007). Assim, consideramos uma interação entre o sistema dopaminérgico e adenosinérgico na modulação excitatória. Esta opinião poderá ser apoiada pelo fato de que o receptor NPSR é expresso em grande quantidade na substância negra (Xu et al., 2007), que é um importante centro dopaminérgico. Assim, podemos sugerir uma ligação entre dopamina, adenosina e NPS

Em conclusão, o estudo mostra que uma ligação entre adenosina e NPS pode representar um novo percurso associado à ação do NPS no cérebro. Várias linhas apontam para uma via comum ativada pela adenosina e NPS através da produção de AMPc em neurônios dopaminérgicos e glutamatérgicos de áreas cerebrais responsáveis pelo controle motor. No entanto, até a presente data, o efeito modulador da adenosina sobre o sistema NPS não era conhecida. Com isso, uma importante inferência desta modulação exercida pela adenosina é que alguns destes efeitos são em condições basais. Em muitos casos, as concentrações basais de adenosina extracelular são suficientes para ativar uma tonificação de uma substância. Essas concentrações basais podem variar de região para região, ficando em torno de 25 – 250 nmol. As concentrações basais de adenosina provavelmente refletem um equilíbrio entre múltiplos mecanismos que aumentam as concentrações extracelulares de adenosina, sua absorção e metabolismo (Dunwiddie & Masino., 2001). Assim, o sistema adenosinérgico poderá contribuir para a ativação de neurônios peptidérgicos, porém estudos adicionais serão necessários para esclarecer o papel do NPS modulado pela adenosina.

5. CONCLUSÃO

- ▶ O NPS na dose de 0,1nmol tem efeito hiperlocomotor;
- ▶ O pré-tratamento de cafeína (3mg/kg), 15 minutos antes da administração de NPS (0,1nmol) tem um efeito de diminuição da atividade locomotora;
- ▶ O co-tratamento i.c.v. de CPT (100nM, 1µl), e NPS 0,1 nmol, aumenta a atividade locomotora dos animais em relação ao grupo controle;
- ▶ O co-tratamento i.c.v. de ZM241385 (100nM, 1µl), e NPS 0,1 nmol, reduz a atividade locomotora dos animais ao nível do grupo controle;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBRACCHIO MP; BRAMBILLA R; CERUTI S; KIM HO; VON LUBITZ DKJE; JACOBSON KA; CATTABENI F. G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. **Molecular Pharmacology** 48:1038-1045. 1995.

BEAR MF; CONNORS BW; PARADISO MA. Neuroscience: exploring the brain. **Artmed**. 2002.

BENOWITZ, NL., Clinical pharmacology of caffeine. **Annual Review of Medicine** 41: 277-288. 1990.

BURNSTOCK G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological Reviews** 87: 659-797. 2007.

CELIK E; UZBAY IT; KARAKAS S. Caffeine and amphetamine produce cross-sensitization to nicotine-induced locomotor activity in mice. **Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 30: 50-5. 2006.

CUNHA-REIS D; RIBEIRO JA; SEBASTIÃO AM. A1 and A2A receptor activation by endogenous adenosine is required for VIP enhancement of K⁺-evoked [3H]-GABA release from rat hippocampal nerve terminals. **Neuroscience Letters**. 430: 207-12. 2008.

DUNWIDDIE TV; MASINO SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**. 24: 31-55. 2001.

FERGUSON SM; ROBINSON TE. Amphetamine-evoked gene expression in striatopallidal neurons: regulation by corticostriatal afferents and the ERK/MAPK signaling cascade. **Journal of Neurochemical** 2: 337-48. 2004.

FISONE G; BORGKVIST A; USIELLO A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cellular and molecular life sciences** 61: 857-72. 2004.

FLAGMEYER, I., HAAS, H.L., STEVENS, D.R. Adenosine A1 receptor-mediated depression of corticostriatal and thalamostriatal glutamatergic synaptic potentials in vitro. **Brain Research** 778: 178-85.1997.

FLORIO C; ROSATI AM; TRAVERSA U; VERTUA R. Inhibitory and excitatory effects of adenosine antagonists on spontaneous locomotor activity in mice. **Life Science** 60: 1477-86. 1997.

FREDHOLM BB; LINDGREN E. Protein kinase C activation increases noradrenaline release from the rat hippocampus and modifies the inhibitory effect of alpha 2-adrenoceptor and adenosine A1-receptor agonists. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**; 5: 477-83. 1988.

FREDHOLM BB. Adenosine receptors and the actions of caffeine. **Pharmacology. Toxicology**. 76:93–101. 1995.

FREDHOLM BB; IJZERMAN AP; JACOBSON KA; KLOTZ K. N; LINDEN J. International Union of Pharmacology.; XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacology. Review** 53: 527– 552. 2001.

GASIOR M; JASZYNA M; PETERS J; GOLDBERG, SR. Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics** 295:1101-11. 2000.

GERFEN CR; ENGBER TM. Molecular neuroanatomic mechanisms of Parkinson's disease: a proposed therapeutic approach. **Neurology Clinical** 10: 435-49. 1992.

GERVITZ LM; NALBANT D; WILLIAMS SC; FOWLER JC;.Adenosine-mediated activation of Akt/protein kinase B in the rat hippocampus in vitro and in vivo. **Neuroscience Letters** 9:175-9; 2002.

HERVÉ D; LE MOINE C; CORVOL JC. $G_{\alpha_{olf}}$ levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. **The Journal of Neuroscience** 21: 4390-4399. 2001.

JAMES JE. **Caffeine and Health**. London : Academic Press. 1997.

JERROLD S. Nicotine and Caffeine, in: **Psychopharmacology: drugs, the brain, and behavior.**; 319-324. 2005.

KAPLAN G.B; GREENBLATT DJ; KENT MA; COTREAU MM; ARCELIN G; SHADER RI. Caffeine-induced behavioral stimulation is dose-dependent and associated with A1 adenosine receptor occupancy. **Neuropsychopharmacology** 6:145-153. 1992.

LARA DL; O Papel da adenosina nos transtornos psiquiátricos graves. in: KAPCZINSKI F; QUEVEDO J; IZQUIERDO I. **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. 2ª. Edição, artmed. 2004.

LENT R. Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociências. **Atheneu**; São Paulo. 2005.

LINDSKOG M; SVENNINGSSON P; POZZI L; KIM Y; FIENBERG AA; BIBB JA; FREDHOLM BB; NAIRN AC; GREENGARD P; FISONE G. Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. **Nature** 418: 774–778. 2002.

MACDONALD RL; SKERRITT JH; WERZ MA. Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture. **Journal of Physiological** 370: 75-90. 1986.

MERIGHI S; BENINI A; MIRANDOLA P; GESSI S; VARANI K; SIMIONI C; LEUNG E; MACLENNAN S; BARALDI PG; BOREA PA. Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells. **Molecular Pharmacology** 72:395-406. 2007.

NOMURA M; ICHIMATSU D; MORITANI S; KOYAMA I; DONG Z; YOKOGAWA K; MIYAMOTO K. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and Akt activation by caffeine. **Molecular Carcinogenic** 44:67-76. 2005.

PALMATIER MI; FUNG EY; BEVINS RA. Effects of chronic caffeine pre-exposure on conditioned and unconditioned psychomotor activity induced by nicotine and amphetamine in rats; **Behavioral Pharmacology** 14:191-8. 2003.

POPOLI P; REGGIO R; PEZZOLA A; FUXE K; FERRE S. Adenosine A₁ and A_{2A} receptor antagonists stimulate motor activity: evidence for an increased effectiveness in aged rats. **Neuroscience Letters** 251: 201-204. 1998.

PORKKA-HEISKANEN T; STRECKER RE; THAKKAR M; BJORKUM A; GREENE RW; MCCARLEY RW. Adenosine: a mediator of the sleepinducing effects of prolonged wakefulness. **Science** 276:1265–1268.1997.

RAINNIE DG; GRUNZE HC; MCCARLEY RW; GREENE RW. Adenosine inhibition of mesopontine cholinergic neurons: implications for EEG arousal. **Science** 263: 689-92. 1994.

REINSCHEID RAINER K and XU YAN-LING. Neuropeptide S as a novel arousal promoting peptide transmitter. **The FEBS Journal** 272: 5689-5693.2005.

REINSCHEID RK. Phylogenetic appearance of neuropeptide S precursor proteins in tetrapods. **Peptides** 28: 830-7. 2007.

SATO S; SHINTANI Y; MIYAJIMA N; YOSHIMURA K. Novel G protein-coupled receptor protein and DNA thereof. **World Patent Application**. 2002.

SHI D; NIKODIJEVIĆ O; JACOBSON KA; DALY JW. Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. **Cellular and molecular neurobiology** 13:247-61. 1993.

SHI D; NIKODIJEVIĆ O; JACOBSON KA; DALY JW. Effects of chronic caffeine on adenosine, dopamine and acetylcholine systems in mice. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie** 328: 261-87. 1994.

SOLENKOVA NV; SOLODUSHKO V; COHEN MV; DOWHEY JM. Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt.; **AJ P Heart and Circulatory Physiology** 290: 441-9. 2006.

STOOF JC; KEBABIAN JW. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. **Nature** 5839: 366-8.1981.

VENDELIN J; BRUCE S; HOLOPAINEN P; PULKKINEN V; RYTILÄ P; PIRSKANEN A; REHN M., LAITINEN T; LAITINEN LA; HAAHTELA T; SAARIALHO-KERE U; LAITINEN A; KERE J. Downstream target genes of the neuropeptide S-NPSR1 pathway. **Human Molecular Genetics** 15: 2923-2935. 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)