



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE



AGLEISON RAMOS OMIDO JUNIOR

EFEITO DA 7 β -HIDROXIETILTEOFILINA E 8-FENILTEOFILINA NA
AQUISIÇÃO E RETENÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL EM CAMUNDONGOS

CAMPO GRANDE
DEZEMBRO DE 2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE



AGLEISON RAMOS OMIDO JUNIOR

**EFEITO DA 7 β -HIDROXIETILTEOFILINA E 8-FENILTEOFILINA NA
AQUISIÇÃO E RETENÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como exigência para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza.

**CAMPO GRANDE
OUTUBRO DE 2014**

Dedico este trabalho a minhas três Marias, minha esposa Maria Angélica e filhas Maria Rita e Maria Clara as quais são os meus motivos de viver. Dedico também a minhas amigas que foram responsáveis pelo incentivo e cobrança deste momento: As Professoras Cintia Pereira, Nathalia Zobiole e Aline Moraes.

AGRADECIMENTOS

A Deus por favorecer a minha vida e oportunizar metas

Ao professor Albert Schiaveto Souza por toda dor de cabeça e problemas que lhe causei, mas contribuiu muito para meus conhecimentos.

A toda minha família que contribui e sempre acreditou no meu crescimento profissional, em especial aos meus pais, Agleison Ramos Omido em quem me espelhei profissionalmente e Conceição Aparecida dos Santos Costa por acreditar em mim, ao meu irmão Clayton da Costa Omido pelo companheirismo, meus tios Neide Maria Dos Santos Costa e Arley Carlos Vieira por me apoiarem e serem meus segundos pais, meus Avós Abrão Mendes da Costa pelos ensinamentos e educação repassados e Abigail Mazarelo Ramos por me criar e proporcionar desenvolvimento acadêmico.

Aos meus superiores da Santa Casa Geraldo Justo e Roberto Madid e da FACSUL Daniela Sopran Gil e Ivan Reatte, por contribuírem e me dispensarem dos serviços em diversos momentos para o término deste projeto.

A todos os professores do curso de enfermagem da FACSUL, em especial Ana Patrícia Ricci, Claudia Ramalheira e Francine Ramos.

Aos meus amigos que podiam se encaixar em qualquer outro parágrafo anterior, mas criei um especialmente a eles: Wesley Gomes, Marlon Oliveira de Oliveira e Reginaldo Omido Junior.

A todos que de certa forma contribuíram para minha formação.

*"Você sabe filha que sempre foi
amada
E tocada pelos ventos da esperança.
Que sua nobre alma também é
morada
Do amor de Deus, numa permanente
aliança"*

Trova de Pedro Ernesto, 27/11/14

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	06
LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE ABREVIATURAS	08
RESUMO	09
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Memória e Aprendizagem.....	14
2.2. Anatomia e Fisiologia da Memória	14
2.3. Memória.....	15
2.4. Adenosina.....	16
2.5. Teofilina.....	18
2.6. Memória Espacial e Modelo Experimental Animal.....	19
3. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos Específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Animais.....	23
4.2. Experimentos e Grupos Experimentais	23
4.3. Labirinto Aquático de Morris (LAM)	26
4.4. Eutanásia dos Animais	27
4.5. Análise Estatística	27
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÕES.....	38
8. REFERÊNCIAS	39
9. ANEXO 1 – Protocolo CEUA	45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Tabela associando a aplicação da 7 β -hidroxietilteofilina pré-treinamento, o grupo experimental e a latência (segundos) para o camundongo encontrar a plataforma por dia de treino/teste. Representado pela média e erro padrão. 28
- Tabela 2. Tabela associando a aplicação da 7 β -hidroxietilteofilina pós-treinamento, o grupo experimental e a latência (segundos) para o camundongo encontrar a plataforma por dia de treino/teste. Representado pela média e erro padrão. 30
- Tabela 3. Tabela associando a aplicação da 8-fenilteofilina pré-treinamento, o grupo experimental e a latência (segundos) para o camundongo encontrar a plataforma por dia de treino/teste. Representado pela média e erro padrão. 31
- Tabela 4. Tabela associando a aplicação da 8-fenilteofilina pós-treinamento, o grupo experimental e a latência (segundos) para o camundongo encontrar a plataforma por dia de treino/teste. Representado pela média e erro padrão. 33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática do teste de memória espacial Labirinto Aquático de Morris (LAM). 21
- Figura 2. Gráfico de linhas ilustrando a latência (segundos) para os camundongos submetidos à aplicação da 7 β -hidroxietilteofilina pré-treinamento para encontrar a plataforma a cada dia de treino/teste. Cada símbolo representa à média e a barra o erro padrão. 29
- Figura 3. Gráfico de linhas ilustrando a latência (segundos) para os camundongos submetidos à aplicação da 7 β -hidroxietilteofilina pós-treinamento para encontrar a plataforma a cada dia de treino/teste. Cada símbolo representa à média e a barra o erro padrão. 30
- Figura 4. Gráfico de linhas ilustrando a latência (segundos) para os camundongos submetidos à aplicação da 8-fenilteofilina pré-treinamento para encontrar a plataforma a cada dia de treino/teste. Cada símbolo representa à média e a barra o erro padrão. 32
- Figura 5. Gráfico de linhas ilustrando a latência (segundos) para os camundongos submetidos à aplicação da 8-fenilteofilina pós-treinamento para encontrar a plataforma a cada dia de treino/teste. Cada símbolo representa à média e a barra o erro padrão. 33

LISTA DE ABREVIATURAS

A₁ - Receptor Metabotrópico de Adenosina do Subtipo A1

A_{2A} - Receptor Metabotrópico de Adenosina do Subtipo A2A

A_{2B} - Receptor Metabotrópico de Adenosina do Subtipo A2B

A₃ - Receptor Metabotrópico de Adenosina do Subtipo A3

ANOVA - análise de variância

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho nacional de Controle de Experimentação de Animal

FACSUL – Faculdade Mato Grosso do Sul

I.p. - intraperitoneal

LAM - Labirinto Aquático de Morris

LTD - Depressão de Longa Duração

LTM - Lobo Temporal Medial

LTP - Potencial de Longa Duração

SNC - Sistema Nervoso Central

THC - Tetrahydrocannabinol

UCDB - Universidade Católica Dom Bosco

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

RESUMO

Introdução: As doenças neurodegenerativas apresentam uma prevalência crescente dentre a população superior a 65 anos e os antagonistas de adenosina tem um papel neuromodulador principalmente na região do hipocampo, contribuindo para a manutenção e melhoria da memória, sendo drogas promissoras para estudos de medicamentos preventivos de complicações de doenças neurodegenerativas. **Objetivo:** Avaliar o efeito de diferentes concentrações de 7 β -hidroxietilteofilina e 8-fenilteofilina, na aquisição e retenção da memória espacial de camundongos. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos suíços, machos, entre 25-30g subdivididos em dois experimentos e para cada experimento foram realizados dois momentos de aplicação, antes e depois da seção do treino/teste. Os camundongos foram submetidos aos treinos no Labirinto Aquáticos de Morris - LAM durante quatro dias (três sessões/dia) e submetidos ao teste após 48 h do último treino, sendo mensurado o tempo para cada animal encontrar a plataforma escondida. Os animais do primeiro experimento (oito animais para cada dosagem da droga) receberam respectivamente solução salina (SF) 10ml/kg, 7 β -hidroxietilteofilina na dosagem de 10, 20 e 40mg/kg 30 minutos antes do treino por via intraperitoneal (i.p.). O segundo experimento utilizou a mesma droga e as mesmas dosagens do primeiro grupo imediatamente após o treino. O terceiro grupo recebeu SF 10ml/kg, 8-fenilteofilina na dosagem de 1, 2 e 4mg/kg i.p. 30 minutos antes do treino. O quarto grupo recebeu a mesma droga e dosagem do terceiro grupo imediatamente após o treino. Os animais foram eutanasiados na câmara de CO₂. Os resultados foram analisados considerando um nível de significância de 5% através do teste estatístico ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey. **Resultados:** As drogas não reduziram a latência para o animal encontrar a plataforma: grupo I (p=0,089), II (p=0,641), III (p=0,089) e IV (p=0,290) com efeito significativo em relação ao dia do treino/teste: grupo I (p<0,001), II (p<0,02), III (p<0,001) e IV (p<0,001). **Conclusão:** Conclui-se que o LAM é um teste útil para avaliação da aquisição e retenção da memória espacial em camundongos e que as drogas experimentais testadas não apresentaram efeito na memória espacial, independente da dosagem e do momento da aplicação.

Palavras-chave: 7 β -hidroxietilteofilina, 8-fenilteofilina, memória espacial e adenosina

ABSTRACT

Introduction: Neurodegenerative diseases have a growing prevalence among the population over 65 years and adenosine antagonists have a neuromodulator role, especially in the hippocampus region, contributing to the maintenance and improvement of memory, with promising drugs for preventive medicine studies of complications neurodegenerative diseases. **Objective:** To evaluate the effect of different concentrations of 7 β -hydroxyethyltheophylline and 8-phenyltheophylline, acquisition and retention of spatial memory in mice. **Methodology:** Used swiss mice, males, 25-30g, subdivided in two experiments for each experiment were two application times, before and after the section of the training/test. The mice were subjected to training in the Water Maze Morris - LAM for four days (three sessions / day) and subjected to the test after 48 h from the last training session, and was measured the time for each animal to find the hidden platform. The animals of the first group (eight animals per dose of the drug) respectively received saline (SF) 10ml / kg, 7 β -hydroxyethyltheophylline at a dose of 10, 20 and 40 mg / kg 30 minutes before training intraperitoneally (ip). The second group used the same drug and the same dosages of the first group immediately after training. The third group received SF 10ml / kg, 8-phenyltheophylline at a dose of 1, 2 and 4 mg / kg ip 30 minutes before training. The fourth group received the same drug dosage and the third group immediately after training. The animals were euthanized in CO2 camera. The results were analyzed considering a 5% significance level by ANOVA two-way repeated measures, followed by Tukey's post-test. **Results:** The drugs did not reduce the latency for the animal to find the platform: Group I (p=0,089), II (p=0,641), III (p=0,089) e IV (p=0,290) with significant effect on the day of training/test: Group I (p<0,001), II (p<0,02), III (p<0,001) e IV (p<0,001). **Conclusion:** It is concluded that LAM is a useful test for assessing the acquisition and retention of spatial memory in mice and tested the experimental drug had no effect on spatial memory, independent of dose and time of application.

Keywords: 7 β -hydroxyethyltheophylline, 8-phenyltheophylline, spatial memory and adenosine.

1. INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas como o Parkinson e o Alzheimer são disfunções degenerativas do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo os sintomas do Parkinson a rigidez, agitação e movimentos mais lentos e o Alzheimer tendo como principal sintoma o comprometimento da memória (Oliver e Rios, 2014). Na atualidade não há terapia preventivas eficazes, apenas medicações sintomáticas para minimizar a evolução destas doenças, sendo considerada a causa mais comum de demência, atingindo 5% da população maior de 65 anos (Zhang et al., 2013, Alloul et al., 1998).

Os efeitos neuroprotetores e a redução de efeitos colaterais produzidos com tratamentos que utilizam antagonistas de receptores de adenosina são comprovados por diversos estudos e são promissores nas terapêuticas para o tratamento de degeneração neural, tal como o induzido pela lesão da medula espinal, acidente vascular cerebral, doenças de Alzheimer e Parkinson, bem como outras doenças conhecidos do SNC (Oliver e Rios, 2014).

Está estabelecido que a adenosina interfere no hipocampo, modulando a plasticidade sináptica através da ativação do receptor A_1 , tendo efeito inibitório na memória (Alhaider et al., 2010).

A adenosina é derivado metabólito, de ação em diversas regiões do corpo e no SNC facilita a liberação de neurotransmissores. Os receptores apresentam afinidade para adenosina são A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 presentes em seres humanos e roedores. Este metabólito tem ação de neuromodulação (Abreu, 2009).

A neuromodulação da adenosina é realizada através da ativação de receptores. O receptor de adenosina A_1 é altamente expresso no córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e região dorsal da medula espinhal, desempenhando um papel importante na modulação da aprendizagem e memória (Sebastião e Ribeiro, 2000).

O bloqueio não seletivo dos receptores de adenosina pela teofilina ou outros antagonistas, bem como o bloqueio seletivo de adenosina A_1 e dos receptores de A_{2A} , facilitam a aprendizagem e a retenção da memória em estudos experimentais (Acuña et al., 2013).

Por isto estudos com drogas que possam atuar como antagonistas de adenosina representam um importante alvo para pesquisas que buscam a melhoria dos sintomas de doenças que apresentam disfunção na neurotransmissão.

Estudos precisam aprofundar a utilização das xantinas nas fases iniciais da doença para investigar suas ações precoces e prevenir a evolução da patologia e seus sintomas, pois foi demonstrado anteriormente que as xantinas aumentam a concentração de serotonina e outros neurotransmissores que melhoram o desempenho e a coordenação neuromuscular (Chu et al, 2012).

Estudos em animais tem demonstrado que as xantinas tem ação neuroprotetora, impedindo a perda de neurônios dopaminérgicos, retardando a degeneração neuronal (Oliver e Rios, 2014).

A cafeína facilita as conexões sinápticas entre as células do SNC inclusive em animais invertebrados (Chittka e Peng, 2014). A cafeína atua na modulação da aprendizagem e funções de memória, provavelmente em virtude da sua ação não seletiva dos receptores antagonistas de adenosina (Alhaider et al., 2010).

Vários pesquisadores têm estudado a relação entre a teofilina e memória/aprendizagem, demonstrando um efeito benéfico da teofilina sobre o comportamento e aprendizagem (Hauber e Bareiss, 2001; Alzoubi et al., 2013; Hu et al., 2007; Assini et al., 2012), outros estudos demonstram que não há diferenças na sua utilização (Xu et al., 2007), algumas pesquisas dizem ainda que a utilização da droga pode prejudicar a memória (Hirose et al., 2004; Springer, et al., 1985; Hung et al., 2002).

As teofilinas agem no sistema renal, cardiovascular, musculatura lisa – especialmente músculo brônquico - e no sistema nervoso central (SNC). No SNC exerce uma ação estimulante, produzindo um estado de alerta, tremor, nervosismo, sono e aumento da respiração. O desempenho motor e mental é facilitado por doses moderadas, mas inibidas em doses maiores, não induzindo a euforia (Rang et al., 2003).

Poucos estudos demonstram a ação da 8-fenilteofilina, mas Ahlijanian e Takemori (1986) sugerem que esta droga tem ação semelhante à cafeína, sendo que a cafeína é três vezes mais potente que a teofilina em receptores

pré-sinápticos de adenosina, sem seletividade de receptor (Clanachan, 1981; Collins e Anson 1981).

A escolha da droga para utilização neste estudo deu-se por entender a importância de se pesquisar um antagonista de adenosina com sua ação neuromoduladora e por perceber na revisão bibliográfica um número reduzido de pesquisa utilizando as teofilinas. Quando era utilizadas a aplicação era para outros sistemas do corpo e com resultados divergentes, desde utilização eficaz ao comprometimento do hipocampo.

Diante desta perspectiva, esse trabalho tem por objetivo estudar o efeito da 7 β -hidroxietilteofilina e 8-fenilteofilina, ambos antagonistas de receptores de adenosina, na aquisição e retenção da memória espacial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Memória e Aprendizagem

A aprendizagem e a memória estão intimamente ligadas, embora sejam coisas distintas, sendo a aprendizagem é o processo de aquisição do conhecimento e a memória são processos de como nós armazenamos, codificamos as informações (Kandel et al., 2003).

A forma de estabelecer a memória é dividida em aquisição, armazenamento ou retenção, consolidação e a evocação de informações. É através deste processo que adquirimos lembranças que contribuem com nosso processo de sobrevivência com o meio (Kandel et al., 2003).

Na aquisição, os estímulos podem ser de fontes internas e externas, sendo de responsabilidade do SNC quais destas informações serão consideradas relevantes para a aquisição. Durante a aquisição, a informação captada é armazenada por tempo determinado, denominado como retenção. Quando as informações são armazenadas por um tempo maior ou por longo prazo é denominado consolidação. O resgate e a utilização das informações armazenadas quando úteis para o animal são denominados evocação (Milner et al., 1998)

O esquecimento é um processo fisiológico útil, pois limita o tempo de armazenamento com o objetivo de impedir e minimizar a sobrecarga do SNC. Este período de retenção é determinado pelo número de vezes em que estas informações são acessadas, podendo ser retidas permanentemente ou, se não necessárias, apagadas (Kandel et al., 2003; Lent, 2004).

2.2. Anatomia e Fisiologia da Memória

Estudos evidenciam a importância do hipocampo e do estriado dorsal como uma das principais estruturas responsáveis pelo sistema de aprendizagem e formação da memória (Woolley et al., 2013).

O hipocampo apoia capacidade de recordações sobre fatos e eventos, ao passo que o estriado dorsal apoia estratégias de habilidades reflexas e motoras (Woolley et al., 2013).

Acredita-se que o neocórtex seja a principal estrutura de armazenamento da memória. O córtex pré-frontal tem como função a intervenção na memória, planejando e solucionando problemas complexos (Gasbarri et al., 2005).

O hipocampo tem a função de codificar novas experiências, fazendo com que as informações sejam armazenadas em memória de longo prazo, sendo essencial na memória espacial. Juntamente com o tálamo e o corpo mamilar, é responsável pela memória recente. A amígdala está relacionada à avaliação afetiva e emocional (Abreu, 2009)

As sinapses são sinais químicos e elétricos exercidas entre os terminais de uma célula nervosa que são transferidos através de uma série de parâmetros bioquímicos para a célula receptora (Emes et al., 2008).

Existem diversos neurotransmissores os quais chamamos de neuromoduladores: a serotonina, a dopamina, a acetilcolina, a noradrenalina, GABA (Ácido Gama-aminobutírico) e poliaminas, que são liberados por neurônios presentes na própria estrutura, no hipocampo ou em estruturas adjacentes (Izquierdo et al., 2001).

2.3. Memória

Sabe-se que mecanismos moleculares e algumas formas de plasticidade neuronal e sináptica estão envolvidas nos processos de aprendizagem e memória, provocando inclusive alterações estruturais no cérebro (Kandel et al., 2003).

A memória e a aprendizagem são processos que ocorrem de forma conjunta e proporcionam de forma flexível, a adaptação dos animais ao ambiente que os rodeia, viabilizando a sobrevivência (Kandel et al., 2003).

A memória pode ser classificada de duas maneiras, quanto ao seu tempo de duração e quanto ao seu conteúdo:

Quanto ao seu tempo, a memória pode ser dividida em memória de curto prazo (memória de trabalho), memória de longo prazo e memória de longa duração (Lent, 2004; Abreu, 2009).

Memória de curto prazo, ou de trabalho, é a capacidade de armazenamento de pequenas informações em um período de tempo pequeno sendo esquecidas rapidamente. A memória de longo prazo é a capacidade de armazenamento por um período de tempo maior, horas ou meses, e está relacionada às experiências vivenciadas. A memória de longo prazo ainda pode ser subdividida em memória de longa duração, memórias que ficam armazenadas por toda a vida e estão relacionadas às experiências que transformam a sensação em cognição (Abreu, 2009).

Quanto ao seu conteúdo, que é a memória para fatos e eventos que aconteceram no decorrer de nossas vidas a memória é dividida em memória declarativa, não declarativa e operacional (Lent, 2004).

A memória declarativa é aquela evocada conscientemente, como lembranças de episódios vivenciados ou aprendidos sobre pessoas e lugares e depende do hipocampo e lobos temporais (Abreu, 2009), podendo se dividir em semântica, que é a memória de fatos, e episódica, que é memória de eventos.

A memória não declarativa ou implícita é aquela evocada pelo inconsciente e que não pode ser verbalizada, está associada a hábitos, emoções, reflexos condicionados e habilidades motoras, como conduzir um automóvel, está sob o controle do corpo estriado (Abreu, 2009).

A memória operacional é o armazenamento de informações para o desenvolvimento de diversas tarefas cognitivas (Lent 2004).

2.4. Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo purínico, sendo metabólito primário envolvido em todas as células, incluindo os neurônios e glia. A liberação da adenosina difere dos demais neurotransmissores, pois as mesmas são liberadas do citoplasma para o espaço extracelular, não se acumulando nas fendas sinápticas (Abreu, 2009).

A adenosina tem ação de modulação do SNC, inibindo e/ou facilitando a liberação de neurotransmissores pré-sinápticamente e hiperpolarizando e/ou despolarizando o neurônio pós-sinápticamente (Abreu, 2009).

Os receptores que apresentam afinidade para adenosina são A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 estando presentes em seres humanos e roedores. A adenosina tem ação de modulação fina (Abreu, 2009).

Como a adenosina tem ação inibitória quanto à modulação da memória, subtem-se que as drogas com ação antagonista à adenosina podem contribuir para ação de estimulação, modulando a aprendizagem e a memória (Prediger et al., 2005).

A neuromodulação da adenosina é realizada através da ativação de receptores de alta afinidade A_1 e A_{2A} e de receptores de baixa afinidade A_{2B} . O receptor de adenosina A_1 é altamente expresso no córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e região dorsal da medula espinhal, desempenhando um papel importante na modulação da aprendizagem e memória (Sebastião e Ribeiro, 2000).

O bloqueio não seletivo dos receptores de adenosina pela teofilina ou outros antagonistas, bem como o bloqueio seletivo de adenosina A_1 e dos receptores de A_{2A} , facilitam a aprendizagem e a retenção da memória em estudos experimentais (Acuña et al., 2013).

A adenosina tem o papel primordial na formação da memória, sendo envolvido na Potencialização de Longa Duração (LTP) e Depressão de Longa Duração (LTD) (Mendonça e Ribeiro, 2001).

A quantidade de adenosina como metabólito é suficiente para um efeito inibitório, já as xantinas atuam como excitatório por seu papel de antagonismo, melhorando a performance mental (Dunwiddie e Masino, 2001).

Embora as xantinas possam atuar como antagonistas de adenosina, elas podem ter efeitos sobre inúmeras classes de neurotransmissores, especialmente a cafeína, trazendo repercussões sistêmicas (Fredholm et al., 1999).

Entre os antagonistas de adenosina, a cafeína é a droga mais pesquisadas para a aquisição e retenção da memória (Angelucci et al., 2002).

2.5. Teofilina

As xantinas são drogas amplamente consumidas pela população mundial, substância psicoestimulante, encontrada facilmente em produtos alimentares de consumo diário como o café, chocolate, chás e bebidas gaseificadas com sabor de “cola”, é largamente utilizada para tratamentos de Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas – DPOC, por ter efeito broncodilatador com ação agonista nos receptores β -2 (Barnes, 2013).

As teofilinas, uma xantina, agem no sistema renal, cardiovascular, musculatura lisa – especialmente músculo brônquico - e no sistema nervoso central (SNC). No SNC exerce uma ação estimulante, produzindo um estado de alerta, tremor, nervosismo, sono e respiração, tendo uma faixa de concentração plasmática para obtenção do efeito terapêutico ótimo de 30 -100 $\mu\text{mol/l}$ (Rang et al., 2003).

A teofilina é uma droga bem absorvida pelo trato gastrointestinal e metabolizada no fígado, com sua meia-vida plasmática por aproximadamente 8 horas em adulto, sendo aumentada na presença de hepatopatia, insuficiência cardíaca e infecções virais, porém reduzida nos fumantes e etilistas (Rang et al., 2003).

A farmacodinâmica desta droga pode variar de acordo com sua concentração plasmática, em que doses menores geralmente têm maiores repercussões pulmonares (10mg/L), já doses mais elevadas podem ocasionar repercussões sistêmicas (25mg/L) (Barnes, 2013).

O desempenho motor e mental é facilitado por doses moderadas, mas inibidas em doses maiores, não induzindo a euforia (Rang et al., 2003).

Poucos estudos demonstram a ação da 8-fenilteofilina, mas Ahlijanian e Takemori (1986) sugerem que esta droga tem ação semelhante à cafeína, sendo a cafeína três vezes mais potente que a teofilina em receptores pré-sinápticos de adenosina, sem seletividade de receptor.

Acuña et al. (2013) dizem que a teofilina é menos potente e eficaz que a cafeína, sugerindo que a cafeína traria melhores resultados para o tratamento de pacientes com Parkinson, embora ambas sejam antagonistas de adenosina e pertençam ao grupo das metilxantinas.

Tem como efeitos conhecidos ser um broncodilatador, com ação anti-inflamatória e a reversão da resistência a corticosteroides. Estudos recentes sugerem que a antinocicepção induzida pela teofilina é devido à liberação de dopamina (Katyal e Gupta, 2012). A teofilina age nos receptores A_1 e A_2 como antagonista de adenosina (Barnes, 2013).

Seus efeitos secundários estão relacionados com as concentrações plasmáticas e incluem náuseas, vômitos e dores de cabeça, em concentrações mais elevadas pode causar arritmias cardíacas e convulsões, devido sua ação antagonista de adenosina nos receptores A_1 (Barnes, 2013).

Por aumentar os riscos de convulsão, Khol et al. (2011) trazem que altas doses de teofilina podem gerar lesões agudas e atrofia no hipocampo com disfunção temporal bilateral, ocorrendo déficits de memória persistente e permanente.

Estudos recentes sugerem que a maioria dos efeitos psicofarmacológicos da xantina sejam mimetizados pelos antagonistas dos receptores A_{2A} e não pelos antagonistas do subtipo A_1 , embora ela seja um antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos (Van Strien et al., 2009).

O estudo do efeito da 7 β -hidroxietilteofilina e 8-fenilteofilina, ambos antagonistas de receptores de adenosina, na aquisição e retenção da memória espacial busca esclarecer seus efeitos neuromodulador e neuroprotetor.

2.6. Memória Espacial

A habilidade de reconhecer experiências já vivenciadas, fazendo correlações entre elas e orientando como proceder, garantiu a sobrevivência de inúmeras espécies. Esta característica é encontrada em animais, que se utilizam do reconhecimento espacial para direcionar suas ações nas diferentes situações impostas pelo meio onde vive. Este processo de informações armazenadas é conhecido como memória espacial (Kessels et al., 2001, Van Strien et al., 2009).

O estudo de memória espacial de animais em ambientes naturais é relativamente difícil devido à dificuldade de controle ambiental. Desta forma,

testes de memória espacial vêm sendo realizados em laboratórios (Fridgeirsdottir, 2014).

Para a avaliação da memória espacial em animais os testes mais comuns e mais aceitos pelos pesquisadores são o Labirinto Aquático de Morris (LAM) e o Labirinto de Barnes, que estão consolidados no meio científico (Fridgeirsdottir, 2014).

O teste do Labirinto Aquático de Morris (LAM) foi desenvolvido por Morris et al., (1981) no início de 1980 para medir o aspecto funcional das lesões no hipocampo de ratos e tornou-se um dos testes mais utilizados para a função do hipocampo e aprendizagem espacial em roedores.

A redução do estresse antes de submeter camundongos ou ratos no LAM é imprescindível para o sucesso do teste, tendo em vista que os labirintos aquáticos são fatores estressores, comprometendo a eficiência do teste (Fridgeirsdottir, 2014).

Apesar de causar mais estresse para os animais submetidos ao LAM, pois se trata de uma metodologia desenvolvida na água que provoca o aumento no nível de ansiedade e estresse do animal, uma variável importante a ser considerada no momento da escolha do protocolo (Harrison et al., 2009).

No LAM, Figura 1, o animal deve procurar a plataforma escondida, que se encontra submersa, devendo o animal ter como ponto de saída as extremidades opostas de onde se encontra a plataforma, sendo a saída de um ponto cardinal distinto em cada treino, não podendo repetir a saída no mesmo dia de treino/teste. Há a necessidade da fixação de pontos de orientação na parte interna do labirinto superior a profundidade da água (Nunez, 2008).

O tempo permitido para restrição da execução e avaliação dos experimentos neste labirinto é discutível, sendo que os animais aprendem rapidamente e a quantidade de treinos é relativamente pequena, potencializando a avaliação no uso de fármacos, favorecendo para distinção de efeitos crônicos e agudos sobre os processos de aprendizagem e memória (Harrison et al., 2009; Nunez, 2008).

Modelos animais são frequentemente utilizados em investigações experimentais, por promoverem o conhecimento dos mecanismos fisiológicos e

dos sistemas, o progresso de patologias e administração de estratégias terapêuticas (Buccafusco et al., 2000; Fox et al., 2007).

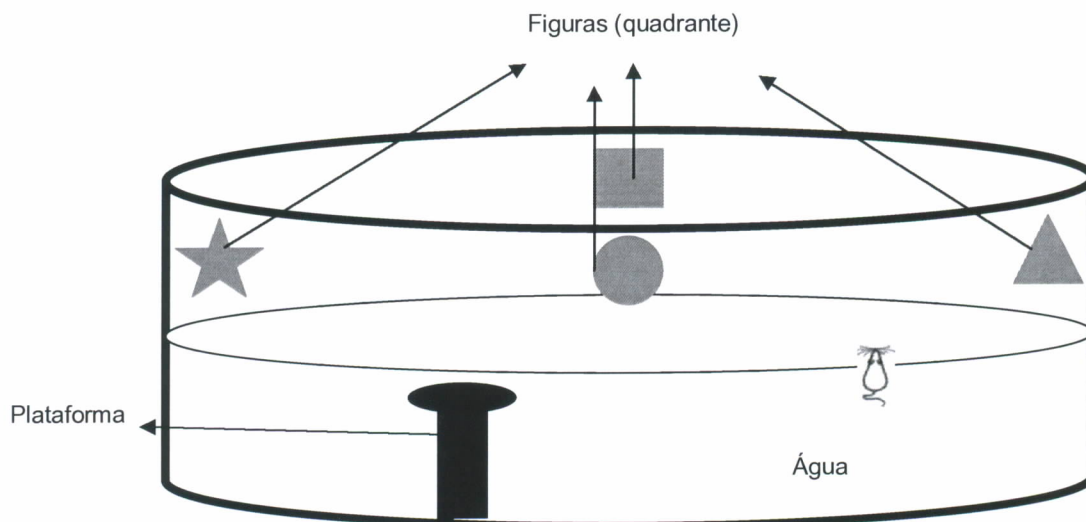


Figura 1. Representação esquemática do teste de memória espacial Labirinto Aquático de Morris (LAM) (Morris et al., 1981).

Como a reprodução do camundongo é rápida, com a gestação curta, além do fácil controle por serem animais pequenos, limpos e pela necessidade de grande quantidade de animais utilizados na pesquisa, são consideradas as maiores vantagens para a utilização nas pesquisas (Schaneider e Silva, 2004).

Meneses e Hong (1998), Angelucci et al., (2002), Prediger et al., (2005) e Björklund et al., (2008) na avaliação do desempenho de camundongos em testes de aprendizado e memória, inclusive em labirintos, concluíram que estes modelos animais mostram-se convenientes na investigação de drogas terapêuticas para disfunções de memória e atenção.

Diante destas informações, a escolha do camundongo da linhagem Suíço mostrou-se conveniente para mensuração da aquisição e retenção da memória espacial proposta por nossos estudos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da 7β -hidroxietilteofilina e 8-fenilteofilina na aquisição e retenção da memória espacial em camundongos suíços.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de 7β -hidroxietilteofilina e 8-fenilteofilina, na aquisição e retenção da memória espacial de camundongos;

Comparar os efeitos das drogas utilizadas neste estudo, na aquisição e retenção da memória espacial dos camundongos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 128 camundongos Suíços machos, pesando entre 25-30g, com aproximadamente 60 dias de vida, oriundos do biotério da UCDB - Universidade Católica Dom Bosco. Os animais foram mantidos no laboratório montado especificamente para os testes na FACSUL – Faculdade Mato Grosso do Sul, em gaiolas de Plexiglas, com água e ração *ad libitum*. O laboratório possui ciclo claro-escuro de 12hs (7-AM e 7-PM) à temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Todos os testes foram realizados no período vespertino (13h às 18h).

O experimento foi realizado com as drogas 7 β -hidroxietilteofilina e 8-fenilteofilina, para cada droga foi utilizada a administração 30 minutos antes do treino teste (aquisição) ou imediatamente após ao treino teste (retenção). A 7 β -hidroxietilteofilina foi diluída em solução salina (0,9% NaCl) e administrada via intraperitoneal (i.p.), nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/kg. A 8-fenilteofilina foi diluída em solução salina (0,9% NaCl) e administrada via intraperitoneal (i.p.), nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/kg, ambas as drogas foram administradas 30 minutos antes (relacionada à aquisição da memória) ou imediatamente após as sessões de treinamento ou testes no Labirinto Aquático de Morris (relacionada à retenção da memória) (Sharifzadeh et al., 1995)

Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do Conselho nacional de Controle e Experimentação de Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições éticas e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob o protocolo 468/2012 (Apêndice A).

4.2. Experimentos e Grupos Experimentais

Foram realizados quatro experimentos em quatro grupos experimentais, com oito animais em cada grupo, os quais foram submetidos a teste de memória espacial no Labirinto Aquático de Morris.

Experimento I: Efeito da 7β -hidroxietilteofilina na aquisição da memória espacial de camundongos suíços:

Grupo 1 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., solução salina à 0,9% em volume de 10ml/kg de peso do animal, 30 minutos antes do treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 2 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 7β -hidroxietilteofilina diluída em solução salina à 0,9% na dose de 10mg/kg de peso do animal, 30 minutos antes do treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 3 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 7β -hidroxietilteofilina diluída em solução salina à 0,9% na dose de 20mg/kg de peso do animal, 30 minutos antes do treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 4 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 7β -hidroxietilteofilina diluída em solução salina à 0,9% na dose de 40mg/kg de peso do animal, 30 minutos antes do treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Experimento II: Efeito da 7β -hidroxietilteofilina na retenção da memória espacial de camundongos suíços:

Grupo 1 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., solução salina à 0,9% em volume de 10ml/kg de peso do animal, imediatamente após o treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 2 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 7β -hidroxietilteofilina diluída em solução salina à 0,9% na dose de 10mg/kg de peso do animal, imediatamente após o treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 3 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 7β -hidroxietilteofilina diluída em solução salina à 0,9% na dose de 20mg/kg de peso do animal, imediatamente após o treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 4 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 7β -hidroxietilteofilina diluída em solução salina à 0,9% na dose de 40mg/kg de

peso do animal, imediatamente após o treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Experimento III: Efeito da 8-fenilteofilina na aquisição da memória espacial de camundongos suíços:

Grupo 1 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., solução salina à 0,9% em volume de 10ml/kg de peso do animal, 30 minutos antes do treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 2 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 8-fenilteofilina diluída em solução salina à 0,9% na dose de 1mg/kg de peso do animal, 30 minutos antes do treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 3 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 8-fenilteofilina diluída em solução salina à 0,9% na dose de 2mg/kg de peso do animal, 30 minutos antes do treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 4 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 8-fenilteofilina diluída em solução salina à 0,9% na dose de 4mg/kg de peso do animal, 30 minutos antes do treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Experimento IV: Efeito da 8-fenilteofilina na retenção da memória espacial de camundongos suíços:

Grupo 1 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., solução salina à 0,9% em volume de 10ml/kg de peso do animal, imediatamente após o treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 2 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 8-fenilteofilina diluída em solução salina à 0,9% na dose de 1mg/kg de peso do animal, imediatamente após o treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 3 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 8-fenilteofilina diluída em solução salina à 0,9% na dose de 2mg/kg de peso do animal, imediatamente após o treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

Grupo 4 (n=8): neste grupo os animais receberam, via i.p., 8-fenilteofilin diluída em solução salina à 0,9% na dose de 4mg/kg de peso do animal, imediatamente após o treino ou teste no Labirinto Aquático de Morris.

4.3. Labirinto Aquático de Morris (LAM)

Este teste avalia a capacidade do animal na aquisição, retenção e evocação da memória espacial, ao se mensurar a latência para que o animal localize uma plataforma submersa em um tanque com água.

Utilizou-se para avaliação dos animais uma adaptação do protocolo descrito por Morris et al. (1981). O Labirinto Aquático de Morris foi composto por uma caixa de água, com 119 cm de diâmetro e 90 cm de profundidade, esta foi pintada de preto e preenchida com água. A temperatura da água foi mantida a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Dentro do Labirinto foi colocada uma plataforma (19,5 x 11,0 cm) submersa a 2 cm da superfície de água, no centro de um dos quatro quadrantes imaginários do tanque e mantido neste local durante todos os treinos e testes. Para a orientação espacial dos animais foram colocados sinalizadores visuais em cada um dos quatro pontos cardeais da parede do tanque. A plataforma foi então posicionada no meio de um dos quadrantes. Na realização do teste/treino, foi mensurada a latência (em segundos) para que o animal encontrasse a plataforma escondida sob a água, após ser deixado em um dos quadrantes. Foram realizados três testes/treinos por dia, durante quatro dias consecutivos (Nunez, 2008).

O animal sempre foi solto de frente para a parede do tanque, saindo de um dos três pontos cardeais restantes (pseudo-aleatório) – que não seja daquele onde a plataforma estava.

Todos os grupos foram submetidos à realização de três treinos diários por quatro dias consecutivos (D1, D2, D3 e D4), um dia de descanso (D5) e teste (D6), respeitando o tempo máximo de latência para encontrar a plataforma de 90 segundos. Caso o animal não encontrasse a plataforma neste período, o mesmo era conduzido até a plataforma.

Após cada treino o animal permanecia na plataforma por 30 segundos, para a memorização espacial, seguido por 60 segundos de descanso em um ambiente sob foco de luz, realizando as saídas dos três pontos cardeais, não repetindo a saída do mesmo ponto em um determinado treino/teste.

A aquisição e retenção da memória espacial foram avaliada durante os quatro dias de treino e 48 horas após os treinos (teste) no Labirinto Aquático de

Morris. Em ambos os casos, foram mensurados a latência (em segundos) para que o animal encontrasse a plataforma escondida sob a água do tanque.

4.4. Eutanásia dos Animais

Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados na câmara de CO₂. Os animais foram congelados e em seguida encaminhados para incineração, realizada pelos responsáveis pelo lixo biológico da UCDB.

4.5. Análise Estatística

Os resultados obtidos por meio dos testes de comportamento foram analisados estatisticamente pelo programa estatístico *SigmaPlot for Windows*[®], na versão 12.5, considerando um nível de significância de 5%.

Os fatores tempo e dosagem foram comparados por análise de variância de duas vias de medidas repetidas paramétricas (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas), seguido pelo pós-teste de Tukey.

4. RESULTADOS

Os resultados referentes à aplicação de 7 β -hidroetilteofilina pré-treinamento, no Labirinto Aquático de Morris, estão apresentados na Tabela 2 e Figura 4. A análise geral dos resultados mostrou que não houve efeito do grupo experimental em relação à dosagem da droga utilizada (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, $p=0,089$), porém houve efeito significativo em relação ao dia do treino/teste ($p<0,001$) sem interação entre grupo experimental e dia do treino/teste ($p=0,605$). No pós-teste ficou evidenciado que a latência para encontrar a plataforma no D4 (4º dia de treinamento) e no D6 (teste), independente do grupo, foi menor do que aquela de D1 e D2 (1º e 2º dias de treinamento), (pós-teste Tukey $p<0,05$). Além disso, a latência de D4 (4º dia de treinamento) foi menor do que aquela observada em D3 (3º dia de treinamento) ($p<0,05$).

Tabela 1. Tabela associando a aplicação da 7 β -hidroxietilteofilina pré-treinamento, o grupo experimental e a latência (segundos) para o camundongo encontrar a plataforma por dia de treino/teste.

Dia de treino/teste	Aplicação da droga pré-treinamento			
	Grupo experimental			
	Controle	7- β (10mg/kg)	7- β (20mg/kg)	7- β (40mg/kg)
D1	70,08 $\pm$ 7,57	78,79 $\pm$ 4,91	72,08 $\pm$ 4,75	62,75 $\pm$ 10,02
D2	75,13 $\pm$ 7,31	82,29 $\pm$ 4,80	71,67 $\pm$ 7,74	57,96 $\pm$ 8,83
D3	70,13 $\pm$ 7,09	76,00 $\pm$ 7,48	70,58 $\pm$ 8,96	62,33 $\pm$ 9,07
D4	64,08 $\pm$ 7,32	67,75 $\pm$ 10,95	50,33 $\pm$ 9,29	49,08 $\pm$ 7,46
D6 -Teste	50,38 $\pm$ 6,21	68,88 $\pm$ 9,41	65,46 $\pm$ 7,05	41,71 $\pm$ 8,28

Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão.

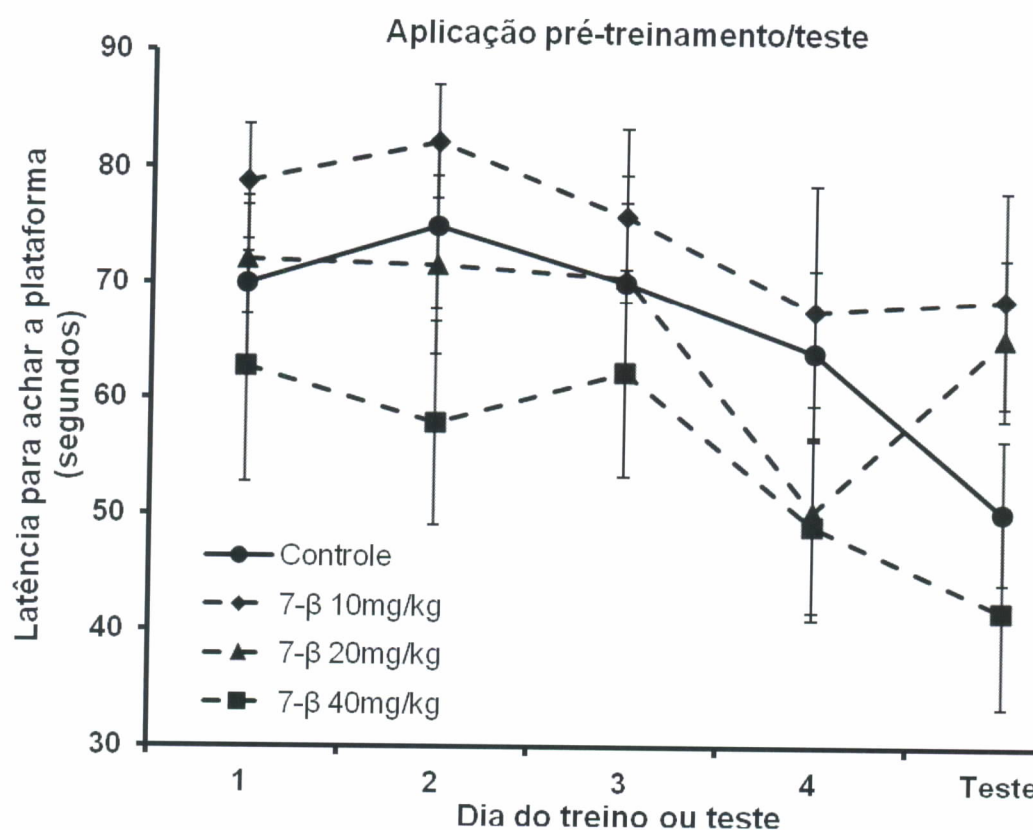


Figura 2. Gráfico de linhas ilustrando a latência (segundos) para os camundongos submetidos à aplicação da 7β-hidroxielteofilina pré-treinamento para encontrar a plataforma a cada dia de treino/teste. Cada símbolo representa à média e a barra o erro padrão.

Os resultados referentes à aplicação de 7β-hidroxielteofilina pós-treinamento, no Labirinto Aquático de Morris, estão apresentados na Tabela 3 e Figura 5. A análise geral dos resultados mostrou que não houve efeito do grupo experimental em relação à dosagem da droga utilizada (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, $p=0,641$), porém houve efeito significativo em relação ao dia do treino/teste ($p<0,02$) sem interação entre grupo experimental e dia do treino/teste ($p=0,60$). No pós-teste ficou evidenciado que a latência para encontrar a plataforma em D6 (teste), independente do grupo, foi menor do que aquela em D1 (1º dia de treinamento), (pós-teste Tukey $p<0,05$).

Tabela 2. Tabela associando a aplicação da 7 β -hidroxietilteofilina pós-treinamento, o grupo experimental e a latência (segundos) para o camundongo encontrar a plataforma por dia de treino/teste. Representado pela média e erro padrão.

Dia de treino/teste	Aplicação da droga pós-treinamento			
	Grupo experimental			
	Controle	7- β (10mg/kg)	7- β (20mg/kg)	7- β (40mg/kg)
D1	67,04 $\pm$ 7,34	73,13 $\pm$ 6,30	65,13 $\pm$ 10,54	68,42 $\pm$ 6,20
D2	61,58 $\pm$ 8,14	63,13 $\pm$ 9,90	62,83 $\pm$ 10,74	73,08 $\pm$ 6,66
D3	58,67 $\pm$ 8,51	59,42 $\pm$ 9,06	73,92 $\pm$ 8,10	82,83 $\pm$ 3,00
D4	57,46 $\pm$ 10,72	58,00 $\pm$ 9,57	49,83 $\pm$ 9,33	63,75 $\pm$ 6,88
D6 - Teste	37,08 $\pm$ 9,00	59,13 $\pm$ 8,89	65,63 $\pm$ 10,61	56,57 $\pm$ 8,84

Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão.

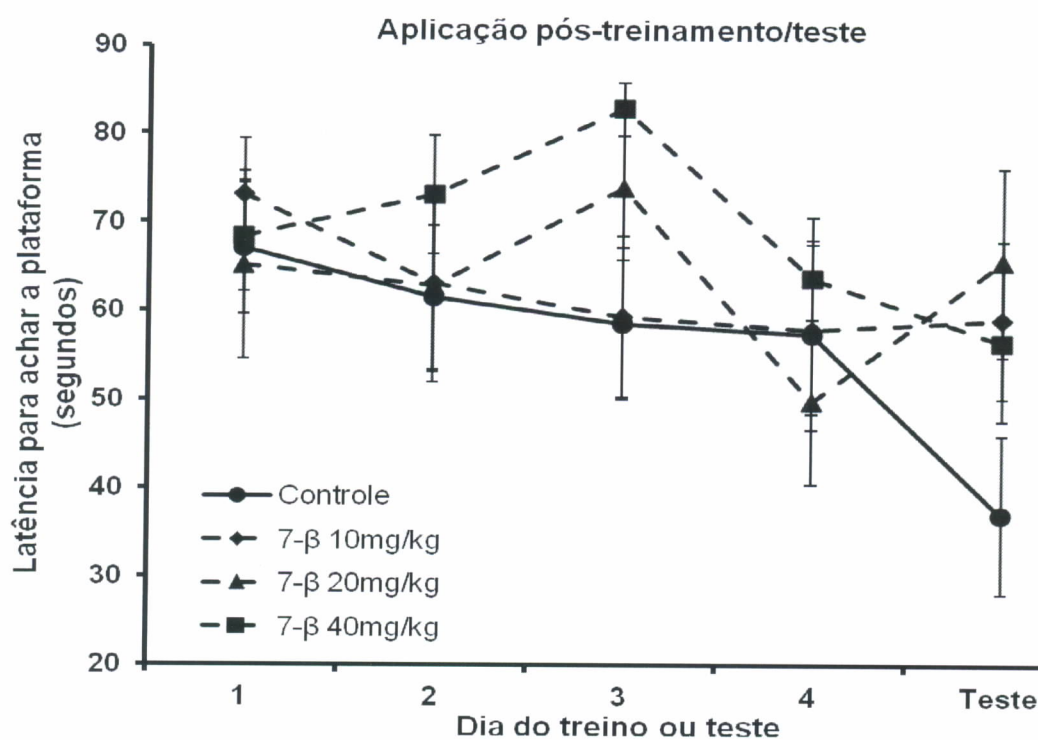


Figura 3. Gráfico de linhas ilustrando a latência (segundos) para os camundongos submetidos à aplicação da 7 β -hidroxietilteofilina pós-treinamento para encontrar a plataforma a cada dia de treino/teste. Cada símbolo representa à média e a barra o erro padrão.

Os resultados referentes à aplicação de 8-fenilteofilina pré-treinamento, no Labirinto Aquático de Morris, estão apresentados na Tabela 4 e Figura 6. A análise geral dos resultados mostrou que não houve efeito do grupo experimental em relação à dosagem da droga utilizada (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, $p=0,089$), porém houve efeito significativo em relação ao dia do treino/teste ($p<0,001$) sem interação do grupo experimental e dia do treino/teste ($p=0,605$). No pós-teste ficou evidenciado que a latência para encontrar a plataforma no D4 (4º dia de treinamento) e no D6 (teste), independente do grupo, foi menor do que aquela de D1 e D2 (1º e 2º dias de treinamento), (pós-teste Tukey $p<0,05$). Além disso, a latência de D4 (4º dia de treinamento) foi menor do que aquela observada em D3 (3º dia de treinamento) ($p<0,05$).

Tabela 3. Tabela associando a aplicação da 8-fenilteofilina pré-treinamento, o grupo experimental e a latência (segundos) para o camundongo encontrar a plataforma por dia de treino/teste. Representado pela média e erro padrão.

Aplicação da droga pré-treinamento				
Dia de treino/teste	Grupo experimental			
	Controle	8-fenilteofilina (1mg/kg)	8-fenilteofilina (2mg/kg)	8-fenilteofilina (4mg/kg)
D1	62,75±10,01	72,08±4,75	78,79±4,91	70,08±7,57
D2	57,96±8,83	71,67±7,74	82,29±4,80	75,13±7,31
D3	62,33±9,06	70,58±8,96	76,00±7,50	70,13±7,10
D4	49,08±7,46	50,33±9,29	67,75±10,95	64,08±7,32
D6 -Teste	41,71±8,28	65,46±7,05	75,35±5,68	50,38±6,21

Os dados estão apresentados em média±erro padrão.

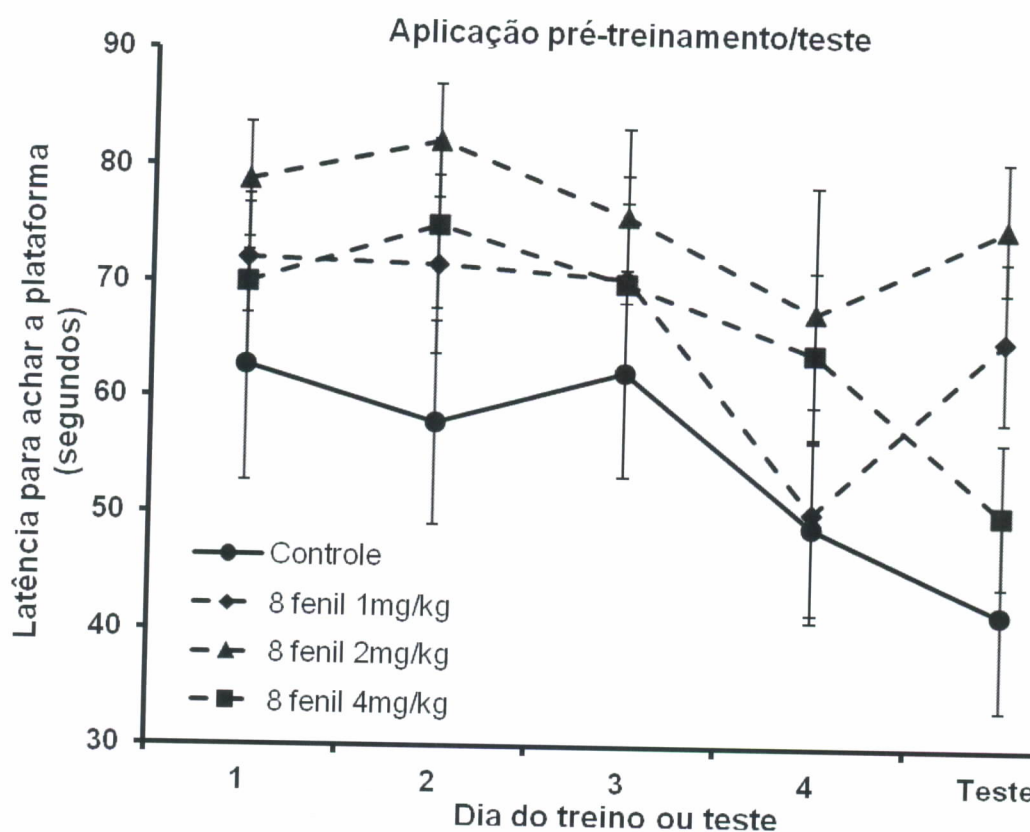


Figura 4. Gráfico de linhas ilustrando a latência (segundos) para os camundongos submetidos à aplicação da 8-fenilteofilina pré-treinamento para encontrar a plataforma a cada dia de treino/teste. Cada símbolo representa à média e a barra o erro padrão.

Os resultados referentes à aplicação de 8-fenilteofilina pós-treinamento, no Labirinto Aquático de Morris, estão apresentados na Tabela 5 e Figura 7. A análise geral dos resultados mostrou que não houve efeito do grupo experimental em relação à dosagem da droga utilizada (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, $p=0,290$), porém houve efeito significativo em relação ao dia do treino/teste ($p<0,001$) e interação entre o grupo experimental e dia do treino/teste ($p=0,034$). O pós-teste evidenciou que o grupo controle não apresentou diferença entre os dias de treino/testes. O grupo com dosagem de 1mg/kg teve um resultados menores em D6 (teste) do que D1 e D3 (1º e 3º dia de treinamento). O grupo com dosagem de 2mg/kg teve um tempo menor em D3, D4 e D6 (3º e 4º dia de treinamento e teste) do que D1 (1º dia de treinamento). O grupo com dosagem de 4mg/kg não apresentou diferença entre os dias de treino/testes (pós-teste Tukey $p<0,05$). O pós-teste demonstra ainda que não houve interação entre os grupos experimentais e os dias de treino/teste (pós-teste Tukey $p<0,05$).

Tabela 4. Tabela associando a aplicação da 8-fenilteofilina pós-treinamento, o grupo experimental e a latência (segundos) para o camundongo encontrar a plataforma por dia de treino/teste. Representado pela média e erro padrão.

Dia de treino/teste	Aplicação da droga pós-treinamento			
	Grupo experimental			
	Controle	8-fenilteofilina (1mg/kg)	8-fenilteofilina (2mg/kg)	8-fenilteofilina (4mg/kg)
D1	68,71±6,39	65,46±8,24	80,42±5,15	72,71±8,18
D2	76,21±7,81	47,33±7,64	58,88±8,51	64,33±10,77
D3	62,17±8,51	35,96±9,28	45,92±7,71	65,42±8,33
D4	56,63±10,73	46,00±8,04	46,00±6,05	65,21±9,75
D6 -Teste	52,83±12,12	31,29±6,34	34,21±8,10	59,50±8,28

Os dados estão apresentados em média±erro padrão.

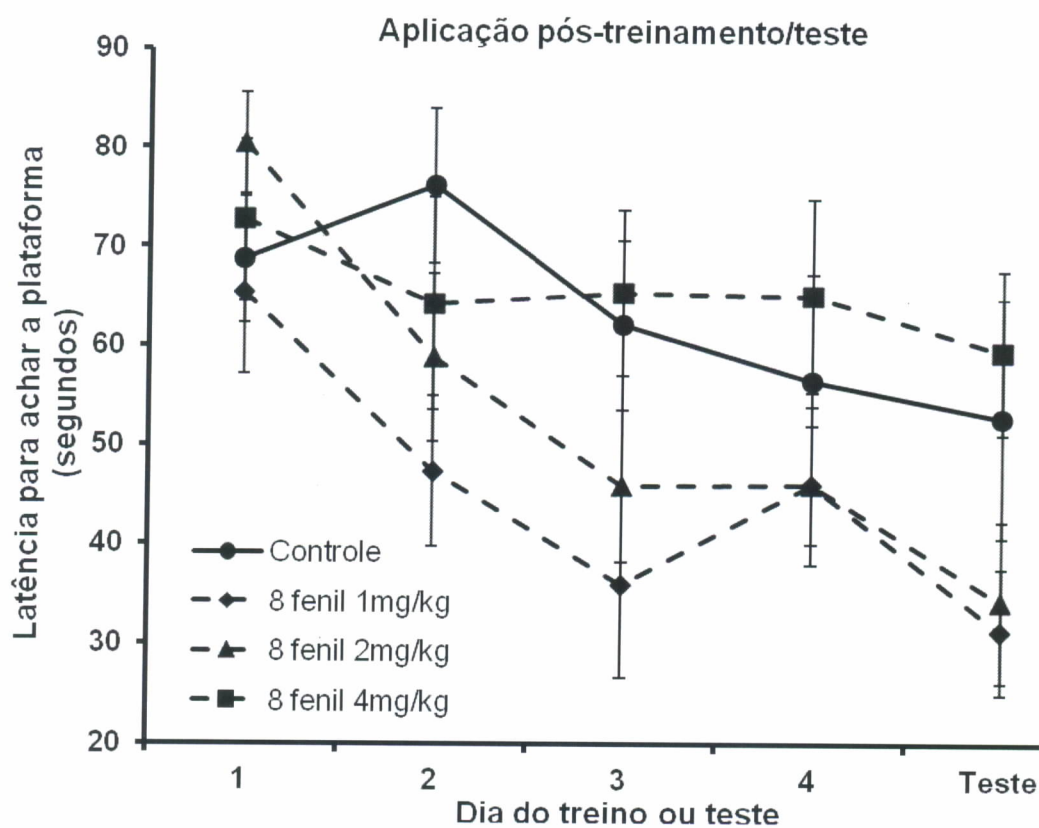


Figura 5. Gráfico de linhas ilustrando a latência (segundos) para os camundongos submetidos à aplicação da 8-fenilteofilina pós-treinamento para encontrar a plataforma a cada dia de treino/teste. Cada símbolo representa à média e a barra o erro padrão.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que o protocolo de avaliação da memória espacial utilizado, LAM, foi capaz de evidenciar a aquisição e retenção da memória espacial em camundongos, uma vez que os animais dos grupos experimentais diminuíram a latência para encontrar a plataforma no decorrer dos dias de treino e no dia do teste.

Estes resultados concordam com outras pesquisas que demonstram que ao longo do treinamento há uma redução do tempo de latência para o animal encontrar a plataforma (Prediger et al., 2005a; Sik et al., 2003), estudos estes que utilizaram o mesmo labirinto (LAM).

Os resultados referentes aos grupos experimentais, 7 β -hidroxietilteofilina e o 8-fenilteofilina nas diversas doses testadas, aplicadas antes do treino/teste, não apresentaram interação ao grupo controle, em relação a diminuição do tempo de latência para encontrarem a plataforma.

Os mesmos resultados foram observados para o grupo experimental, 7 β -hidroxietilteofilina, independente da dosagem testada para as aplicações após o treino/teste, quando também comparados ao grupo controle.

Para o grupo experimental, 8-fenilteofilina, para as aplicações pós treino/teste os resultados demonstraram uma interação entre o grupo experimental por dia de treino/teste, mas que não ficou evidenciado com a realização do pós-teste.

Um ponto de destaque é que as pesquisas relacionadas às xantinas comumente trazem informações sobre a ação do fármaco no sistema pulmonar, renal e cardíaco. Quando os estudos trazem sua ação no SNC, em sua grande maioria, a droga pesquisada é a cafeína.

Apesar de inúmeras pesquisas apontarem o efeito estimulante para o SNC, as drogas antagonistas de adenosina, em especial as xantinas, não ficou evidenciado neste estudo que a droga reduziu o tempo de latência do animal em encontrar a plataforma.

Para Xu et al. (2007) a teofilina não apresenta nenhum efeito de aquisição e retenção da memória, mas a droga atenuou os efeitos degenerativos da radiação de micro-ondas na aquisição da memória.

Outro estudo demonstra que a teofilina em doses terapêuticas pode prejudicar o aprendizado e a memória de animais em desenvolvimento e sem efeitos em animais desenvolvidos (Hirose et al., 2004).

Acredita-se que ação da teofilina em prejudicar a memória se dá pela indução da substância a dopamina e a ligação no receptor β -adrenérgico, onde contribuindo para atenuação da memória (Hirose et al., 2004).

Pode-se considerar também a atuação da substância como Nucleotídeo Cíclico Fosfodiesterase (AMP), que são enzimas que catalisam a hidrólise de AMP Cíclico formando adenosina (Hirose et al., 2004).

Outra hipótese da ausência de efeito da teofilina na memória pode ser dada por não afetar somente os agonista de A_1 , mas também os antagonistas de NMDA não competitivo e antagonista de H_3 , estes receptores importantes na plasticidade sináptica (Hirose et al., 2004).

Estudo retrospectivo em humanos traz um possível efeito adverso de teofilina em crianças asmáticas. Eles demonstraram correlação significativa entre o uso de teofilina e desatenção, hiperatividade, irritabilidade, dificuldade de lidar com a criança e comportamento retraído (Springer et al., 1985).

Hung et al. (2002) traz que a utilização da aminofilina, em ratos com crises epiléticas contribui para o déficit de memória espacial, já sua associação com outra droga (lítio+pilocarpina), além do déficit de memória, os animais apresentaram deficiência motora e alterações morfológicas, como perda de células neuronais.

Há relato de caso clínico que apresenta a teofilina como causador de intoxicação em humano (homem de 55 anos) que desenvolveu síndrome amnésica pós-crise epilética, apresentando lesão bilateral e atrofia em hipocampo (Khol, et al., 2011)

Já para Hauber e Bareiss (2001) a teofilina contribui na aquisição e retenção da memória espacial, contrariando os resultados obtidos neste estudo, embora o teste memória utilizado fosse outro, mas reforçam que o efeito da teofilina pode variar muito com os horários dos testes realizados.

Outras pesquisas demonstraram que a pentoxifilina, xantina antagonista de adenosina, apresentou efeitos benéficos à memória espacial em ratos, utilizando o labirinto aquático de braço radial em animais submetidos à

privação do sono (Alzoubi et al., 2013) e utilizando também o Labirinto Aquático de Morris (Hu et al., 2007).

Florian (2011) descreve que a 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina contribui favoravelmente para a memória espacial em ratos submetidos à privação do sono e sua associação concomitantemente com canabinóide também trouxe melhoras da plasticidade sináptica do hipocampo (Assini et al., 2012).

Em outra pesquisa, o autor analisa a ação e a interação da cafeína e da privação do sono na função cognitiva e plasticidade sináptica concluindo que doses baixas e crônicas de cafeína não interferem na construção da memória, mas têm efeito protetor na plasticidade sináptica (Alhaider et al., 2010).

Já Chu et al. (2012) demonstraram que a utilização da cafeína em longo prazo colabora para manutenção da memória em animais submetidos a privação do sono. A utilização da cafeína não melhorou o desempenho motor (velocidade) dos animais submetidos ao LAM no estudo de Chu et al. (2012). Em relação à velocidade, este estudo não pode chegar à conclusão, pois nesta pesquisa não monitoramos sua velocidade.

A cafeína não apresentou efeito benéfico na memória quando associado com Tetrahydrocannabinol (THC). Pelo contrário potencializou os efeitos amnésicos do THC (Panlilio et al., 2011). Mas Souza et al. (2011) afirma que a cafeína na concentração de 3 mg/kg interferiu de forma significativa no desempenho da memória espacial em ratos submetidos a exposição ao THC.

Para a cafeína é sabido que sua ação, como antagonista de adenosina, sofre muitas variações em relação à dosagem, tempo de administração e tempo de utilização. Concluindo que para o efeito modulador da memória há necessidades de doses moderadas, sendo que no caso de superdosagem irá apresentar uma redução do efeito (Takahashi et al., 2008).

Para uma ação benéfica da cafeína há necessidade de uma dosagem moderada, mas a classificação sobre a dosagem considerada alta não é consensual na literatura (Björklund et al., 2008).

Estudo realizado em 3047 participantes que avaliou o consumo da cafeína, álcool e a nutrição de uma diversidade de população, demonstrou o benefício dos domínios cognitivos, por efeito protetor da cafeína e da ingestão

adequada de nutrientes, minimizando o comprometimento que ocorre com o decorrer da idade e com a utilização do álcool (Beydoun et al., 2014).

Botton et al., (2010) utilizou modelo animal (camundongos) para a avaliação da cafeína como droga preventiva na disfunção da consolidação da memória. Este estudo utilizou 349 animais, que receberam cafeína (10mg/kg) por quatro dias consecutivos. No quinto dia, o animal recebia bromidrato de escopolamina (2mg/kg) 15 minutos antes do treino ou imediatamente depois. Foi avaliado a memória de curto e de longo prazo no reconhecimento de objeto, tempo de esquiva inibitória e por teste de campo aberto. Ficou evidenciado que a droga contribuiu na aquisição da memória de curto e longo prazo sem causar hiperlocomoção no teste de campo aberto. Já para retenção da memória ela não foi tão efetiva por ter sido suspenso a administração da droga 48 horas antes do teste de retenção.

Considerando a utilização da droga em humanos, adultos jovens, nos quais se avaliou a associação de cafeína e glicose em testes de memória e coordenação, onde o indivíduo que utilizava isoladamente a cafeína e a glicose apresentou melhora na cognição em relação a atividades simples, mais ligadas ao raciocínio. A associação de glicose e cafeína se mostrou eficaz para processos complexos de atenção e memória, sem ocasionar qualquer alteração comportamental (Adam e Grabulosa, 2010). Dados semelhantes a este foram encontrados no estudo de Grabulosa et al. (2010), no qual pacientes que utilizaram estas drogas associadas e independentes demonstraram ativação parietal bilateral e córtex pré-frontal esquerdo, áreas relacionadas à atenção sustentada e memória de trabalho.

As contradições sobre os efeitos das xantinas no hipocampo e na memória podem ser decorrentes da droga utilizada no estudo, dosagens, tempo de utilização das drogas e protocolo escolhido (Alhaider et al., 2010).

Outros estudos deverão ser realizados para compreender os mecanismos de ação das teofilinas, principalmente no SNC, em que as pesquisas são escassas, tendo em vista que a grande maioria dos estudos com esta droga é focada na sua ação no sistema respiratório. Uma outra sugestão é que outros estudos sejam realizados com uma amostra maior de animais, onde o efeito da droga possa ser mais evidente.

7. CONCLUSÕES

Este estudo nos permite concluir que:

- A metodologia utilizada, Labirinto Aquático de Morris (LAM), produziu resultados compatíveis aos encontrados na literatura para avaliação de comportamento, aquisição e retenção de memória espacial em camundongos, consolidando a padronização metodológica.
- A utilização da droga 7 β -hidroxietilteofilina, independente das dosagens (10, 20 e 40 mg/kg) e do momento da administração da droga, pré-treino e pós treino não auxiliou na aprendizagem, aquisição e retenção da memória espacial.
- A utilização da droga 8-fenilteofilina, independente das dosagens (1, 2 e 4 mg/kg) e do momento da administração da droga, pré-treino e pós treino não auxiliou na aprendizagem, aquisição e retenção da memória espacial.

8. REFERÊNCIAS

- Abreu, R. V.; Efeito promnésico e antioxidante do café no sistema nervoso central de ratos. Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências de Alimentos, da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2009
- Acuña L. M. M., García J. L. B., Cervera F. J. A., Góngora, A. J. L. Caffeine has greater potency and efficacy than theophylline to reverse the motor impairment caused by chronic but not acute interruption of striatal dopaminergic transmission in rats. *Neuropharmacology*. 70: 51-62. 2013.
- Adan, A., Grabulosa, J. M. S.; Effects of caffeine and glucose, alone and combined, on cognitive performance. *Hum. Psychopharmacol Clin Exp*, 25: 310-317. 2010.
- Alhaider, I. A., Aleisa, A. M., Tran, T. T., Alzoubi, K. H., Alkadhi, K. A.; Chronic Caffeine Treatment Prevents Sleep Deprivation-Induced Impairment of Cognitive Function and Synaptic Plasticity. *Sleep*, 33(4). 2010.
- Alloul, K., Sauriol, L., Kennedy, W., Laurier, C., Tessier, G., Novosel, S., Contandriopoulos, A.; Alzheimer's disease: a review of the disease, its epidemiology and economic impact. *Arch. Gerontol. Geriatrics*, 27: 189–221, 1998.
- Ahlijanian, M. K.; Takemori, A. E. Effects of caffeine and 8-phenyltheophylline on the actions of purines and opiates in the guinea-pig ileum. *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 236 (1): 171-176. 1986.
- Alzoubi K. H., Khabour, O. F., Tashtoush, N. H., Al-Azzam, S. I., Mhaidat, N. M.; Evaluation of the effect of pentoxifylline on sleep-deprivation induced memory impairment. *Hippocampus*. 23 (9): 812-819. 2013.
- Angelucci, M.E.M., Cesário, C., Hiroi, R.H., Rosalen, P.L., and Da Cunha, C. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris Water Maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Res*. 35: 1201-1208. 2002.
- Assini F. L., Nakamura, C. A., Piermartiri, T. C., Tasca, C. I., Takahashi, R. N.; Coadministration of cannabinoid CB1-receptor and adenosine A1-receptor antagonists improves the acquisition of spatial memory in mice: participation of glutamatergic neurotransmission. *Behav Pharmacol*. 23(3): 292-301. 2012.
- Barnes, P. J., Theophylline. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*. 188 (8): 901-906. 2013.
- Bartus, R.T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Experimental Neurology* 163: 495-529. 2000.

- Beydoun, M. A., Gamaldo, A. A., Beydoun, H. A., Tanaka, T., Tucker, K. L., Talegawkar, S. A., Ferrucci, L., Zonderman, A. B.; Caffeine and Alcohol Intakes and Overall Nutrient Adequacy Are Associated with Longitudinal Cognitive Performance among U.S. Adults. *The Journal of Nutrition* Nutritional Epidemiology. 2014.
- Björklund, O., Kahlström, J., Salmi, P., and Fredholm, B.B. Perinatal caffeine, acting on maternal adenosine A(1) receptors, causes long-lasting behavioral changes in mouse off spring. *Plos ONE*. 3 (12): 3977. 2008.
- Bottona, P. H., Costa, M. S., Ardaia, A. P., Mioranza, S., Souza, D. O., Rocha, J. B. T. R., Porciúncula, L. O.; Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behavioural Brain Research*. 214: 254-259. 2010
- Buccafusco, J. J. Methods of behavior analysis in neuroscience. In *Methods and New Frontiers in Neuroscience Series* (S. A. Simon and M. A. L. Nicolelis, Eds.). CRC Press, New York. 2000.
- Chu, Y. F., Chang, W. H., Black, R. M., Liu, J. R., Sompol, P., Chen, Y., Wei, H., Zhao, Q., Cheng, I. H.; Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid b1–42 levels in an Alzheimer's mouse model. *Food Chemistry*, 135: 2095-2102. 2012.
- Chittka, L., Peng, L.; Caffeine Boosts Bees' Memories. *Science*, 339. 2014.
- Clanachan, A. S. Antagonism of presynaptic adenosine receptors by theophylline 9-beta-d-ribose and 8-phenyltheophylline. *canadian journal of physiology and pharmacology*. 59 (6): 603-606. 1981.
- Collins, G. G., Anson, J., Antagonism of presynaptic adenosine receptors by theophylline 9-beta-D-ribose and 8-phenyltheophylline. *Canadian Journal of physiology and pharmacology*. 59 (6): 603-606. 1981.
- Cunha R.A. Cafeína, receptores de adenosina, memoria y enfermedad de Alzheimer. *Med. Clin Barcelona*. 131(20):790-795. 2008.
- De Mendonça, A.; Ribeiro, J.A. Adenosine and synaptic plasticity. *Drug Dev. Res.*, 52: 283–290. 2001.
- Dunwiddie, T.V.; Masino, S.A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.*, 24: p. 31–55, 2001.
- Esperidião, V. A, Majeski, M. C., Toledo, M. M., Moraes, G. M., Fernandes, J. J., Assis, M. B., Siqueira, R. B.; Neurobiologia das emoções. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 35(2): 55-65. 2008.
- Emes, R.D., Pocklington, A.J., Anderson, C.N., Bayes, A., Collins, M.O., Vickers, C.A., Croning, M.D., Malik, B.R., Choudhary, J.S., Armstrong, J.D.,

- Grant, S.G. 2008. Nat. Neurosci. Evolutionary expansion and anatomical specialization of synapse proteome complexity. 11(7): 799-806. 2008.
- Erikson, G.C., Hager, L.B., Houseworth, C., Dungan, J., Petros, T and Beckwith, B.E. The effects of caffeine on memory for word lists. *Physiology and Behavior*. 35: 47-51. 1985.
- Esperidião, A. V., Colombo, M. M., Monteverde, D. T., Martins, G. M., Fernandes, J. J., Assis, M. B., Batista, R. S.; *Neurobiologia das emoções. Revista de psiquiatria clinica* : 35(2): 55-65. 2008.
- Fisher S., Guillet, R. Neonatal caffeine alters passive avoidance retention in rats in an age- and gender-related manner. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 98 (1): 145 - 149. 1997.
- Florian, C., Vecsey, C. G., Halassa, M. M., Haydon, P. G., Abel, T.; Astrocyte-derived Adenosine and A₁ Receptor Activity Contribute to Sleep Loss-Induced Deficits in Hippocampal Synaptic Plasticity and Memory in Mice. *Journal Neuroscience*. 31 (19): 6956-6962. 2011.
- Fox, J.G., Barthold, S.W., Davisson, M.T. and Newcomer, C.E. The mouse in biomedical research. Academic Press. 2^a Edição. 2007.
- Fredholm, B.B.; Battig, K.; Holmen, J.; Nehlig, A.; Zvartau, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.*, 5: 83-133, 1999.
- Fridgeirsdottir, G. A., Hillered, L., Clausen, F.; Escalated handling of young C57BL/6 mice results in altered Morris water maze performance. *Upsala journal of medical sciences*. 119 (1): 1-9. 2014.
- 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* 56: 483-493. 1991.
- Gasbarri, A., Pompili, A., Arnone, B., D'Onofrio, A., Marchetti, A., Tavares, M.C., and Tomaz C. Declarative memory retention and emotional stimuli. A study of an Italian sample. 20: 157-162. 2005.
- Grabulosa, J. M. S., Adan, A, Falcón, C., Bargallo, N.; Glucose and caffeine effects on sustained attention: an exploratory fMRI study. *Hum. Psychopharmacol Clin Exp*, 25: 543-552. 2010
- Harrison, F.E., Hosseini, A.H., and McDonald, M.P. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav. Brain. Res.* 198: 247-51. 2009.
- 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* 118:43–52. 2001.

Hirose, M., Yokoyama, H. Linuma, K.; Theophylline impairs memory/learning in developing mice. *Brain & Development*, 26: 448-52. 2004.

Hu R., Yuan, B. X., Su, L. Z., Wei, X. Z., Zhao, L. M., Kang, J., Chen, D.; Pentoxifylline promotes learning and memory function of aging rats and mice with induced memory impairment. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 27 (11): 1734-1737. 2007.

Hung, P. L., Lai, M. C., Yang, S. N., Wang, C. L., Liou, C. W., Wu, C.L., Wang, T. J., Huang, L. T.; Aminophylline exacerbates status epilepticus-induced neuronal damages in immature rats: a morphological, motor and behavioral study. *Epilepsy Reserch*. 49 (3): 218-25. 2002.

Hudzik, T.J., Wenger, G.R. Effects of drugs of abuse and cholinergic agents on delayed matching-to-sample responding in the squirrel monkey. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1: 120-127.1993.

Izquierdo, J.A., Costas, S.M., Justel, E.A., and Rabiller, G. Effects of caffeine on memory of the mouse. *Pharmacology Biochemical Behavior* , 1: 7-10. 1978.

Izquierdo, L.A., Viola, H., Barros, D.M., Alonso, M., Vianna, M.R., Furman, M., Levi de Stein, M., Szapiro, G., Rodrigues, C., Choi, H., Medina, J.H., and Izquierdo, I. Novelty enhances retrieval: molecular mechanisms involved in rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 13: 1464-1467. 2001.

Kandel, F.R., Schwartz, J.H. e Jessell, T.M. *Principles of Neural Science* New York, McGraw-Hill. 2003

Katyal, J., Gupta, Y. K.; Dopamine Release is Involved in Antinociceptive Effect of Theophylline. *Int Journal Neurosci*. 122 (1): 17-21. 2012

Kessels, R.P.C., de Haan, E.H.F., Kappele, L.J., and Postma, A. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Reviews* 35: 295-303. 2001.

Khol, Z., Uvanik, G., Lurding, R., Schiierer, G., Bogdahn, U., Schroder, M., Weidner.; Selective bilateral hippocampal lesions after theophylline-induced status epilepticus causes a permanent amnesic syndrome. *J Clin Neurosci*;18 (7): 964-966. 2011.

Lent, R. Cem bilhões de neurônios. Conceitos fundamentais de Neurosciência. Editora Atheneu, Rio de Janeiro. 311-324. 2004

McGaugh, J.L. Memory: A century of consolidation. *Science* 287: 248-251. 2000

- Meneses, A., Hong, E. Spontaneously hypertensive rats: a potential model to identify drugs for treatment of learning disorders. *Hypertension* 31: 968–972. 1998.
- Milner, B., Squire, L.R., Kandel, E.R. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20: 445–468. 1998
- Morris, R.G.M. Spatial localisation does not depend on the presence of local cues. *Learn. Motiv.* 12: 239–260. 1981
- Nunez J. Morris Water Maze experiment. *Journal of visualized Experiments* 2008.
- Oliver, M. R., Rios, M. D.; Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: A review. *Life Sci.* 101(0): 1-9. 2014.
- Panlilio, L. V., Ferré, S., Yasar, S., Thorndike, E. B., Schindler, C. W., Goldberg, S. R.; Combined effects of THC and caffeine on working memory in rats. *British Journal of Pharmacology*, 164: 2529-2538. 2012.
- Prediger, R.D., Fernandes, D., and Takahashi, R.N. Blockade Of Adenosine A2A Receptors Reverses Short-Term Social Memory Impairments In Spontaneously Hypertensive Rats. *Behav Brain Res.* 159: 197-205. 2005
- Prediger, R.D., Pamplona, F.A., Fernandes, D. and Takahashi, R.N.. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD -- the spontaneously hypertensive rat SHR. *Int J Neuropsychopharmacol.* 4: 583-94. 2005a.
- Rang, H. P; Dale, M. M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. *Farmacologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.
- Sansone, M., Battaglia, M and Castellano, C. Effect of caffeine and nicotine on avoidance learning in mice: lack of interaction. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46: 765-767. 1994.
- Schanaider, A., Silva, P. C.; *Uso de animais em cirurgia experimental. Acta Cir Bras [serial online]*, 19 (4): 2004.
- Sebastião, A.M.; Ribeiro, J.A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 341–346, 2000.
- Sharifzadeh, M; Zarrindast, M. R.; Samini, M.; Effects of Adenosine Analogues on Apomorphine-induced Penile Erection in Rats. *Gen Pharmacol*, 26 (8) : 1785 – 1790. 1995.

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

Smith, A., Maben, A., Brockman, P. Effects of evening meals and caffeine on cognitive performance mood and cardiovascular functioning. *Appetite* 22: 57-65. 1994.

Springer, C., Goldenberg, B., Ben Dov, I., Godfrey, S.; Clinical, physiologic, and psychologic comparison of treatment by cromolyn theophylline in childhood asthma. *Journal Allergy Clin Immunol*: 76: 64–69. 1985.

Sousa, V. C., Assaife-Lopes, N., Ribeiro, J. A., Pratt, J. A., Brett, R. R., Sebastião, A. M.; Regulation of hippocampal cannabinoid CB1 receptor actions by adenosine A1 receptors and chronic caffeine administration: implications for the effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on spatial memory. *Neuropsychopharmacology*. 36 (2): 472-487. 2011

Takahashi, R.N., Pamplona, F.A. and Prediger, R.D. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. *Frontiers in Bioscience* 13: 2614-2632. 2008.

Terry, W.S., Phifer, B.; Caffeine and memory performance on the AVL T Journal of Clinical Psychology 42: 860-863. 1986.

Van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M. and Witter, M.P. The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 272-282. 2009.

Xu, Z. W., Hou, B., Li, Y. F., Gao, Y., Su, Z. T., Yang, G. S., Zhao, S. F., He, F. C., Zhang, C. G.; Theophylline attenuates microwave-induced impairment of memory acquisition. *Neuroscience letters*, 412: 129-133. 2007.

Woolley, D. G., Laeremans, A., Gantois, I., Mantini, D. Vermaercke, B., Beeck, H. P. O., Swinnen, S. P., Wenderoth, N., Arckens, L., D'Hooze, R.; Homologous involvement of striatum and prefrontal cortex in rodent and human water maze learning. *Neuroscience*. 110, (8), 3131-3136. 2013.

Zhang, B., Gaiteri, C., Bodea, L. G., Wang, Z., McElwee, J. Podtelezhnikov, A. A., Zhang, C., Xie, T., Tran, L., Dobrin, R., Fluder, E., Clurman, B., Melquist, S., Narayanan, M., Suver, C., Shah, H., Mahajan, M., Gillis, T., Mysore, J., MacDonald, M. E., Lamb, J. R., Bennett, D. A., Molony, C., Stone, D. J., Gudnason, V., Myers, A. J., Schadt, E. E., Neumann, H.; Integrated Systems Approach Identifies Genetic Nodes and Networks in Late-Onset Alzheimer's Disease. *Cell*. 53 (3): 707-720. 2013.

ANEXO 1
Protocolo CEUA



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 468 /2012 do Pesquisador Albert Schiaveto de Souza , referente ao projeto de pesquisa, "Efeito da 7-(beta-hidroxietil) teofilina e 8-fenilteofilina, na aquisição e retenção da memória espacial em camundongos", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 21 de novembro de 2012 .

Joice Stein
Coordenadora da CEUA

Campo Grande, 27 de novembro de 2012.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184