



Id.: CR-31

## **EFEITO NEUROPROTETOR DA CAFEÍNA NAS DESORDENS COMPORTAMENTAIS E NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS A RADIAÇÃO IONIZANTE**

**Mauricio M. da S. Borges<sup>1</sup>, Jhon Brandon F. Ferreira<sup>1</sup>, Luciana P. de M. Teixeira<sup>1</sup>, Gabriel M. de Oliveira<sup>2</sup>, Heitor G. de Souza Saraiva<sup>1</sup>, Ryan L. Lima Duarte do Nascimento<sup>1</sup>, Verônica B. M. IKaWa<sup>1</sup>, Cláudio Sergio C. Lau<sup>1</sup>, André R. da C. Barreto-Vianna<sup>3</sup>, Penha C. Barradas Daltro Santos<sup>2</sup>, Luís Alexandre G. Magalhães, Cláudio C. Filgueiras<sup>4</sup>, Samara Cristina Ferreira-Machado<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Ciências Radiológicas, DCR, IBRAG, UERJ

<sup>2</sup>Laboratório de Neurobiologia, DCF, IBRAG, UERJ

<sup>3</sup>Departamento de Biociências, UFPR

<sup>4</sup>Laboratório de Neurofisiologia, DCF, IBRAG, UERJ

**Palavras-chave:** Déficit Cognitivo. Neuroinflamação. Cafeína. Cérebro. Radiação ionizante. Microglia.

### **RESUMO**

**Introdução:** A radioterapia é uma intervenção crucial no tratamento de tumores cerebrais e metástases, apesar dos riscos associados à sua aplicação, como a indução de processo inflamatório em tecidos saudáveis adjacentes, comprometendo a qualidade de vida pós-tratamento. Em contraste, estudos indicam que a cafeína possui propriedades anti-inflamatórias e pode retardar a progressão de doenças neurodegenerativas. **Objetivo:** Como objetivo avaliar se a cafeína administrada continuamente é capaz de mitigar a neuroinflamação e as alterações comportamentais em camundongos com cérebros irradiados. **Metodologia:** Para isso, camundongos C57BL/6 machos foram divididos em quatro grupos: controle (C), irradiado (I), cafeína (Ca), e irradiado + cafeína (ICa). Os grupos irradiados receberam uma dose única de 10 Gy no cérebro, enquanto os grupos com cafeína tiveram acesso à mesma de forma livre (0,25 g/L) diariamente ao longo do experimento. O comportamento dos animais foi avaliado por testes de Campo Aberto e Localização de Objetos nos dias 15-18 e 90-93 após irradiação e início do consumo de cafeína. Além disso, foram realizadas análises por imunofluorescência de Iba-1 e TNF- $\alpha$  no hipocampo e ELISA para TNF- $\alpha$  plasmático após os testes comportamentais finais. **Resultados:** Os resultados demonstraram que nos primeiros dias após a irradiação (15<sup>o</sup>-17<sup>o</sup> dia), os grupos irradiados (I) e os que consumiram cafeína (Ca) exibiram atividade locomotora periférica menor em comparação ao controle (C), com diferenças mais acentuadas nos dias 16 e 17. No entanto, o grupo ICa mostrou uma atividade significativamente maior no 15<sup>o</sup> dia, com redução subsequente nos dias seguintes. Entre os dias 90-92, o grupo irradiado (I) apresentou menor atividade, sem diferenças significativas entre os grupos C, Ca e ICa. Nos testes de Localização de Objetos, tanto no 18<sup>o</sup> quanto no 93<sup>o</sup> dia, a irradiação reduziu a exploração do objeto cuja posição foi modificada, e a cafeína mitigou esse efeito. A imunomarcagem para TNF- $\alpha$  foi reduzida e a de Iba-1 aumentou na presença de cafeína, sugerindo sua capacidade de mitigar a neuroinflamação. **Conclusão:** A administração oral diária de cafeína após irradiação cerebral total melhorou significativamente tanto a neuroinflamação quanto as alterações comportamentais induzidas pela radiação. Embora sejam necessários mais estudos, esses achados apontam para a cafeína como um potencial método terapêutico farmacológico para tratar os efeitos colaterais da radiação ionizante.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 RADIOTERAPIA

A radioterapia é uma das principais intervenções no controle de tumores cerebrais e metástases presentes nesta região. Apesar dos benefícios associados a essa prática, como o aumento da sobrevivência do paciente, uma das principais desvantagens é que a radiação, além de promover a morte de células neoplásicas, também alcança o tecido saudável adjacente [1]. Pesquisadores e radioterapeutas tentaram descrever e compreender os fenômenos produzidos pela radiação ionizante, tanto clinicamente quanto em sistemas biológicos [2]. Desde a descoberta da radiação, mais de um século de pesquisa tem fornecido informações extensivas sobre os mecanismos biológicos pelos quais esta pode afetar a saúde [3]. Esse efeito pode ser melhor entendido quando se compreende que cada órgão é formado por um conjunto de tecidos e células que apresentam radiosensibilidades diferentes [4]. Um dos exemplos retratados na literatura está relacionado à irradiação do encéfalo. As lesões cerebrais radioinduzidas comprometem a qualidade de vida do paciente e surgem aproximadamente 3-6 meses após o início do tratamento [5]. Dentre os efeitos relatados, a perda de memória vem sendo notificada em mais de 50% dos pacientes e esse efeito tem sido associado a uma inflamação crônica e progressiva que exacerba a lesão neuronal.

Trabalhos vêm relatando que uma dose única de 10 Grays (Gy) pode causar um aumento da proliferação e ativação da micróglia em roedores, levando ao aumento da interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), citocinas pró-inflamatórias envolvidas em diversos processos neuroinflamatórios e doenças neurodegenerativas [6]. Esse modelo vem sendo empregado para avaliar os efeitos radioinduzidos no cérebro. Apesar disso, estudos mais recentes levantam a possibilidade de que a irradiação cerebral pode ter impactos significativos diferentes de acordo com as áreas de importância [7]. Assim, pode-se supor que a mera redução da neurogênese oferece uma visão simplista das alterações totais que ocorrem no cérebro após a irradiação. Pelo menos três mecanismos podem ser citados como responsáveis pela redução da neurogênese após a radioterapia: a perda de células-tronco neurais por morte celular, principalmente por apoptose induzida por quebras duplas no DNA; as modificações microvasculares; e a neuroinflamação induzida pela radiação ionizante, que altera o microambiente, causando uma mudança da neurogênese para gliogênese [8-10]. Dentre esses três principais mecanismos envolvidos na formação da radiolesão, o presente trabalho enfatiza a neuroinflamação induzida pela radiação.

### 1.2 CAFEÍNA

A cafeína foi isolada do café pela primeira vez em 1820 por Friedlieb Ferdinand Runge e chamada de “Kaffebase” [11]. No ano de 1827, Oudry isolou o mesmo composto da *Camellia sinensis*, conhecida como chá-da-índia ou chá verde, e nessa pesquisa foi possível demonstrar efeitos fisiológicos semelhantes aos da cafeína. Evidências epidemiológicas sugerem que o consumo de cafeína reduz o risco de várias doenças neurológicas e neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson (DP) e Alzheimer (DA) [12-13]. No entanto, apesar dos efeitos benéficos do seu consumo na saúde humana e no comportamento, os mecanismos pelos quais a cafeína afeta a fisiopatologia das doenças neurodegenerativas ainda precisam ser esclarecidos. Uma hipótese é que a cafeína controle a resposta neuroinflamatória mediada por micróglia. Já foi descrito que a modulação dos receptores de adenosina (A2AR) pela cafeína proporciona neuroproteção ao controlar a reatividade da micróglia e a neuroinflamação [14]. Uma redução da expressão de CD68 (um marcador da micróglia reativa) nas células microgliais sinaliza a capacidade de interromper ou mitigar a neuroinflamação e a neurodegeneração. Os mecanismos bioquímicos subjacentes às ações da cafeína variam com a dose. No cérebro, os alvos moleculares da cafeína em doses não tóxicas são os receptores de adenosina A1 e A2A [15]. Uma das ações mais reconhecidas da cafeína é a sua capacidade de reduzir o sono e a sonolência, devido à sua atuação sobre o receptor A2AR [16]. A cafeína também está associada a alterações na liberação de neurotransmissores e ao aumento do disparo neuronal (via A1R), como



observado na melhora da transmissão dopaminérgica (via A2AR), afetando processos neuronais associados ao humor e à cognição [17]. Além disso, a cafeína demonstrou controlar a plasticidade sináptica para reverter deficiências de memória e evitar alterações de humor desencadeadas por estresse [18].

A proteção física do hipocampo durante a irradiação é de extrema importância para a qualidade de vida do paciente oncológico. No entanto, dependendo do alvo de irradiação pretendido, essa proteção pode não ser viável. As barreiras físicas podem não ser a única estratégia para mitigar os déficits cognitivos após o tratamento [19-22]. A ausência de trabalhos que retratem o efeito da radiação no cérebro e sua associação com a cafeína justifica a importância de se pesquisar e compreender melhor seus potenciais interativos. A hipótese deste trabalho é que a cafeína administrada de forma contínua, logo após a exposição do cérebro à radiação ionizante, pode diminuir ou prevenir a disfunção cognitiva e mitigar a resposta inflamatória induzida por este agente físico.

## 2. METODOLOGIA

Para simular a radioterapia de cérebro total (WBR, do inglês Whole-Brain Radiation Therapy), a dose de 10 Gy foi escolhida com base em protocolos encontrados em modelos animais (camundongos), que indicam que essa dose é capaz de gerar déficit cognitivo no animal. Assim, foi possível estudar formas de mitigar esse efeito, sendo o uso de cafeína a abordagem adotada neste estudo. Para a avaliação de possíveis alterações comportamentais por comprometimento cerebral, foi utilizado o teste de Reconhecimento de Objetos (RO).

### 2.1 PROCEDIMENTO DE IRRADIAÇÃO

Os camundongos foram organizados em grupos ( $n^{\circ}$  total = 56 animais,  $n=14$  por grupo), conforme demonstrado na Tab. 1. Os cérebros dos camundongos dos grupos I e ICa foram irradiados com fótons de raios-X. O irradiador estava programado com as seguintes condições: 250 kV, 3 mA e um filtro de 0,3 mm de cobre (Cu). Os cérebros receberam uma dose única de 10 Gy, utilizando o Micro Irradiador SARRP 200 (Small Animal Radiation Research Platform 200), localizado no Laboratório de Ciências Radiológicas (LCR), Departamento de Ciências Radiológicas (DCR), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Um camundongo por vez foi anestesiado via intraperitoneal (ip) com uma mistura de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e foram irradiados em posição de pronação. Os olhos foram protegidos com uma placa de chumbo de 2 mm de espessura. Após a irradiação, os animais foram retornados para as gaiolas, onde permaneceram até a eutanásia. Os grupos C e Ca passaram pelos mesmos procedimentos, exceto que não foram irradiados. O presente estudo contou com a aprovação da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) / IBRAG da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob protocolo n° 013/2021.

Tab. 1. Organização dos grupos experimentais

| <b>Grupos</b>     | <b>Siglas</b> | <b>Condições de tratamento</b>        |
|-------------------|---------------|---------------------------------------|
| Controle          | C             | Água filtrada                         |
| Irradiado         | I             | Água Filtrada, Irradiado 10 Gy        |
| Cafeína           | Ca            | Cafeína (0,25 mg/L)                   |
| Irradiado Cafeína | ICa           | Cafeína (0,25 mg/L) e Irradiado 10 Gy |

### 2.2 ADMINISTRAÇÃO DE CAFEÍNA

A cafeína (1,3,7-Trimethylxanthine, Sigma-Aldrich ReagentPlus®) foi diluída em água filtrada e administrada "ad libitum" na concentração de 0,25 g/L, como única fonte de líquido disponibilizada aos animais durante aproximadamente 94 dias. A solução foi trocada a cada dois dias para evitar a



proliferação de microorganismos no interior das garrafas. O consumo era aferido pela diferença entre o volume adicionado (300 mL) no dia da troca e o volume que permanecia no bebedouro utilizado pelos animais. Para uma melhor estimativa do consumo real, o volume que espontaneamente gotejava do bebedouro de uma gaiola sem animais foi calculado pela diferença entre o volume que era colocado na garrafa e o que permanecia após dois dias. Os resultados de consumo de água ou cafeína em cada grupo analisado foram divididos pelo número de animais por caixa, permitindo determinar a média de consumo (mL) de solução de cafeína ou água por animal. Os grupos Ca e ICa receberam a solução contendo cafeína, enquanto os grupos C e I passaram pelos mesmos procedimentos, mas receberam apenas água filtrada.

### 2.3 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (RO)

Com o intuito de avaliar a capacidade exploratória e a memória de curto prazo, os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos (RO). O teste é realizado em duas sessões de 5 minutos, sendo a segunda com um intervalo de 70 minutos em relação à primeira. Durante o teste, um animal por vez foi colocado sozinho no canto de uma caixa de acrílico (40 cm x 40 cm x 40 cm) com as laterais pretas e a base transparente, contendo marcações de 16 quadrados (10 cm x 10 cm). Na primeira sessão (T1), ao entrar na caixa de acrílico, o animal encontrou dois objetos iguais posicionados paralelamente, próximos às quinas de um dos lados da caixa (Fig. 1A). Após 5 minutos na caixa, o animal foi retirado e recolocado em sua gaiola habitual. Em seguida, foi dado um intervalo de 70 minutos para a segunda sessão. Na segunda sessão (T2), um dos objetos sofreu uma alteração de posição, sendo deslocado para a quina adjacente (Fig. 1B), o que naturalmente aguça o interesse exploratório de um animal saudável, sem danos cognitivos relacionados à memória. Durante a troca de animais, as caixas eram higienizadas com uma solução de álcool a 40% para remoção de pistas olfatórias do animal avaliado anteriormente. O comportamento exploratório foi definido como cheirar ou tocar o objeto com o focinho e/ou com as patas dianteiras. O número de toques que cada animal fez ao investigar ativamente os objetos foi registrado manualmente. O aprendizado/memória foi avaliado pelo índice de discriminação, calculado pelo número de toques no objeto com a posição modificada, dividido pelo número total de toques em ambos os objetos. Este teste baseia-se na premissa de que o animal passa mais tempo explorando um objeto novo ou cuja posição foi alterada do que um objeto familiar e, de modo geral, quanto maior o percentual (acima de 60%), melhor o aprendizado.

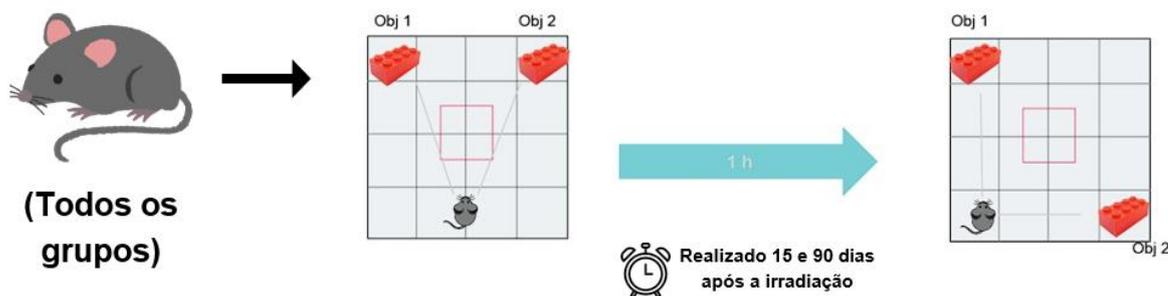


Fig. 1. Configuração experimental para o teste de reconhecimento de objetos. A) Posicionamento dos objetos na primeira sessão. B) Mudança no posicionamento dos objetos na segunda sessão após 70 min.

## 2. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA IBA-1 E TNF- $\alpha$ .

Após 24 horas dos ensaios comportamentais, sete animais de cada grupo foram anestesiados via intraperitoneal (ip) com uma mistura de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Em seguida, foram perfundidos para a obtenção de seus encéfalos. A perfusão transcardíaca com 0,9 % de salina foi realizada por 10 minutos em cada animal, seguida de perfusão com paraformaldeído a 4 % durante 15 minutos e, por último, com paraformaldeído a 4 % contendo sacarose a 20 % em uma concentração molar de 0,1 M durante 10 minutos. Os encéfalos foram removidos e pós-fixados por cerca de 2 horas



no paraformaldeído a 4 % com tampão fosfato PBS, sendo então colocados em soluções crescentes de sacarose a 20 % e 30 % em tampão PBS para crioproteção. Em seguida, os encéfalos foram lavados com PBS para garantir a remoção completa de qualquer resíduo de sacarose. A etapa de remoção da sacarose foi importante para a fixação nas formas de papel alumínio moldadas anteriormente, pois o Optimal Cutting Temperature compound (OCT Fisher HealthCare®) precisa aderir bem ao cérebro e à forma de alumínio para fixar o tecido, protegendo-o contra choques mecânicos e preservando a integridade estrutural. Os encéfalos, juntamente com o OCT, foram congelados em nitrogênio líquido, cuidadosamente, para evitar rachaduras no bloco e no encéfalo, e foram levados ao congelador a -20 °C até o dia do processamento das amostras. No dia do processamento, os encéfalos foram levados ao criostato a -30 °C (LEICA® CM 1850), onde os cortes foram obtidos e colocados em lâminas para realizar os procedimentos de imunomarcção de Iba-1 (marcador de micróglia) – IBA-(019-19741, Wako Chemicals, VA, 1:500) e da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  (PA5-46945, Invitrogen, MA, 1:1000) no hipocampo. Foram tiradas 6 fotos de cada ponto de interesse da região analisada. Essas fotos foram levadas para o software Image Pro-Plus®, onde foi calculada a densidade de micróglia imunomarcadas com Iba-1 e a imunomarcção de TNF- $\alpha$  nas diferentes condições. Para isso, utilizou-se a ferramenta galão de tinta do Image Pro-Plus®, selecionando o espectro de cor emitido pelo fluoróforo de interesse. A cor de interesse foi isolada da imagem e, em seguida, foi feita a contagem dos pixels exibidos. Esses pixels foram então organizados em uma planilha de Excel para análise posterior.

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média e seu erro padrão da média (EPM). A homogeneidade das variâncias foi confirmada pelo teste de normalidade omnibus de D'Agostino e Pearson. As diferenças entre os grupos foram analisadas através do teste one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos, e a quantidade de asteriscos (\*, \*\*\*) representa  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. As análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism, versão 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 TESTE DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS (RO) - 90 DIAS APÓS IRRADIAÇÃO

De acordo com os dados obtidos (Fig. 2), observa-se que todos os grupos ( $n = 14$  animais/grupo) não apresentaram preferência pelos objetos durante a primeira sessão (T1), explorando ambos de forma similar. Na segunda sessão (T2), quando um dos objetos teve a posição alterada, percebe-se o oposto: todos os grupos apresentaram uma diferença significativa no nível de exploração em relação ao T1. Os grupos Controle (C), Cafeína (Ca) e Irradiado Cafeína (ICa) demonstraram um interesse maior pelo objeto com a posição alterada (superior a 60%), em comparação ao outro objeto que permaneceu na mesma posição, indicando uma melhora da memória em relação ao objeto no tempo T1, quando comparados ao grupo Irradiado (I). Entre os grupos supracitados, o grupo C apresentou a maior capacidade de exploração do objeto em T2. O grupo I apresentou uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) no nível de exploração em T2, em comparação aos demais, indicando uma perda da capacidade de retenção de memória causada pela radiação ionizante. Assim, é possível observar que os animais que foram submetidos à radiação e receberam cafeína (ICa) apresentaram uma melhora cognitiva em comparação ao grupo Irradiado (I) durante o tempo T2, quando avaliados em relação ao segundo objeto com a posição trocada.

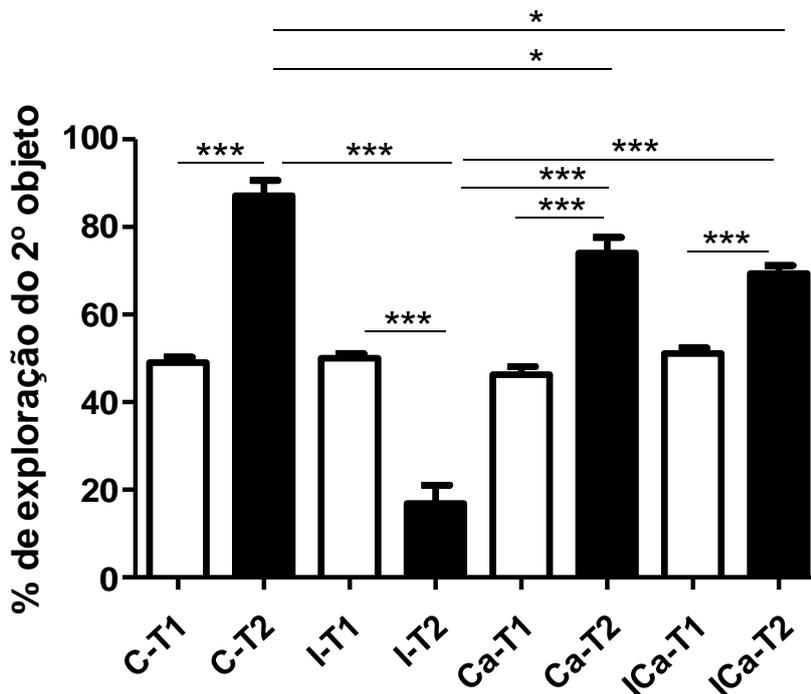


Fig. 2: Percentual de exploração do 2º objeto dos grupos Controle (C), Irradiado (I), Cafeína (Ca), Irradiado Cafeína (ICa), no tempo T1 e T2, irradiados ou não irradiados, tratados ou não com cafeína, no ensaio de Reconhecimento de Objetos após 90 dias da irradiação.  $P < 0,05$  (\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.2 IMUNORREATIVIDADE PARA TNF-A

A densidade da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  foi avaliada por contagem de pixels a partir de lâminas imunomarcadas com o anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , específico para visualização de TNF- $\alpha$ . Observou-se que os animais do grupo I mostraram um aumento na densidade de TNF- $\alpha$  tanto no Corno de Amon (CA) quanto no Giro Dentado (GD), especificamente nas regiões CA1, CA2 e CA3. Os dados obtidos evidenciaram uma redução significativa nos níveis de TNF- $\alpha$  no grupo ICa, quando comparado ao grupo I ( $p < 0,05$ ). Esses resultados indicam que a administração de cafeína está associada à diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  nesse modelo. Imagens representativas da imunomarcagem para TNF- $\alpha$  nas diferentes condições experimentais e nas regiões do hipocampo (CA1, CA2, CA3 e Giro Dentado) podem ser observadas nas Figuras 3 e 4.

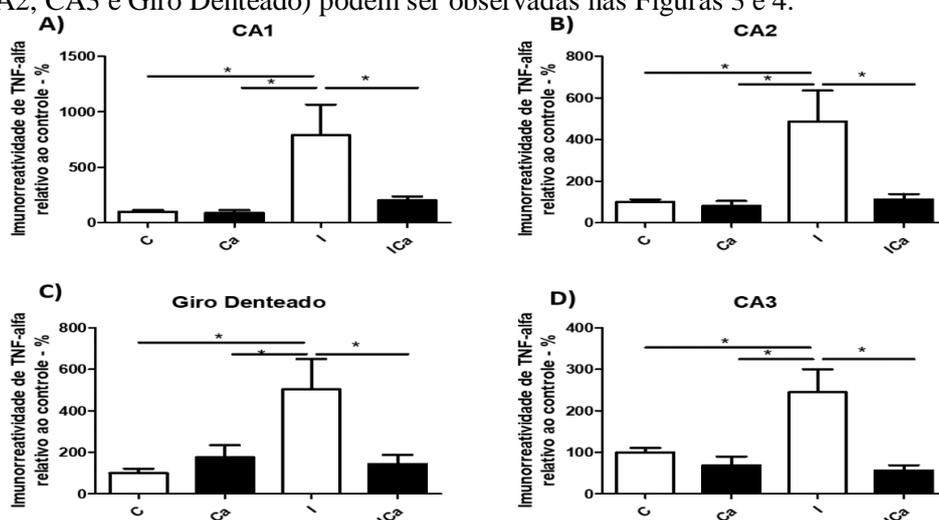


Fig. 3: Densidade da imunomarcagem para TNF- $\alpha$  nas regiões do hipocampo

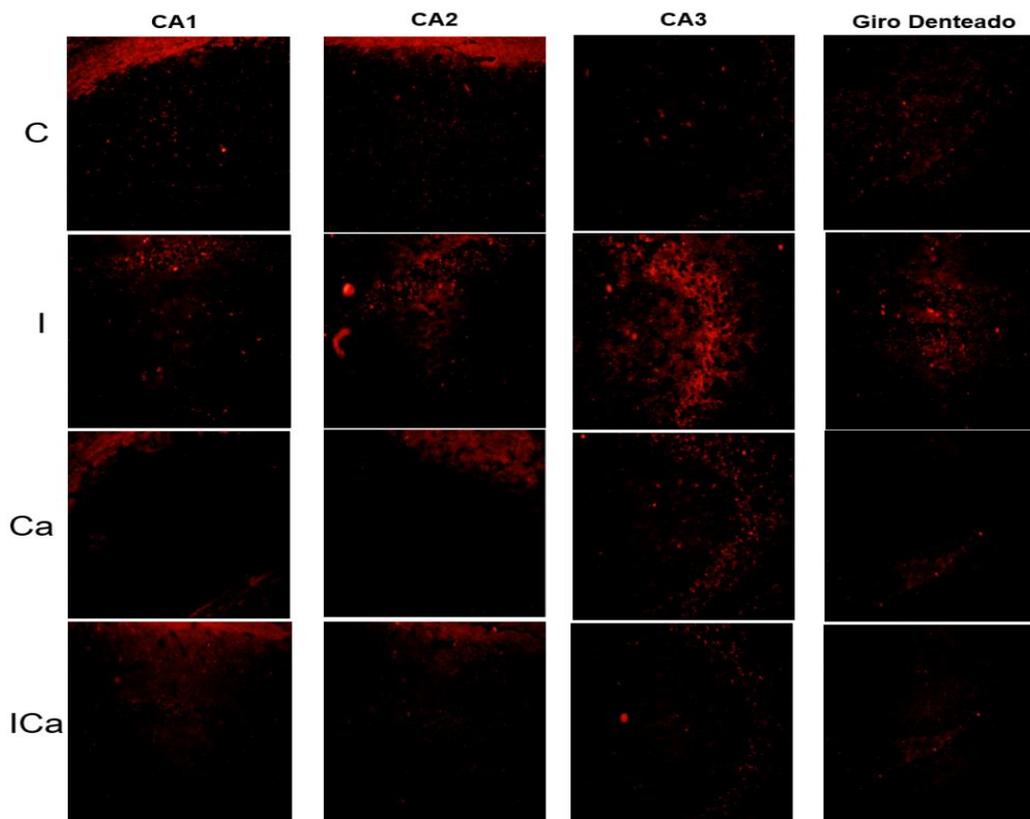


Fig. 4: Representação da imunomarcção para TNF- $\alpha$ . na área CA1, CA2, CA3 e giro-denteado do hipocampo dos camundongos que receberam cafeína e/ou irradiação

#### 4. CONCLUSÃO

A redução significativa observada na memória de curto prazo no grupo I sugere a ocorrência de dano ao tecido cerebral causado pela radiação ionizante, administrada em uma única dose de 10 Gy. Por sua vez, a cafeína, administrada continuamente por 90 dias após a irradiação, foi capaz de mitigar os níveis de TNF- $\alpha$ . Portanto, a cafeína demonstrou um grande potencial para melhorar os déficits cognitivos induzidos pela radiação ionizante no cérebro, configurando-se como uma possível estratégia para reduzir os efeitos colaterais radioinduzidos.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço aos órgãos de fomento CNPQ, FAPERJ e CAPES, a Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), ao Departamento de Ciências Radiológicas (DCR- UERJ), Laboratório de Radiobiologia e ao Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CHANG et al. Neurocognition in patients with brain metastases treated with radiosurgery or radiosurgery plus whole-brain irradiation: a randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*, v. 10, n. 11, p. 1037-1044, 2009.
- [2] HALPERIN et al. *Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2007.
- [3] UNEP. Radiação: efeitos e fontes. Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, 2016. Disponível em: [https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/7790/-Radiation\\_Effects\\_and\\_sources-2016Radiation\\_-\\_Effects\\_and\\_Sources\\_PT.pdg.pdf.pdf?sequence=13&isAllowed=y](https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/7790/-Radiation_Effects_and_sources-2016Radiation_-_Effects_and_Sources_PT.pdg.pdf.pdf?sequence=13&isAllowed=y). Acesso em: 27 de Fevereiro de 2022.
- [4] PINA et al. Construção de um Fantoma Homogêneo para Padronização de Imagens Radiográficas. *Radiologia Brasileira*, v. 33, n. 4, p. 41-44, 2000.
- [5] REENE-SCHLOESSER et al. Radiation-induced cognitive impairment—from bench to bedside. *Neuro-Oncology*, v. 14, p. IV37-IV44, 2012.
- [6] MONJE et al. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nature Medicine*, v. 8, p. 955–962, 2002.
- [7] CONSTANZO et al. Effect of a divided caffeine dose on endurance cycling performance, postexercise urinary caffeine concentration, and plasma paraxanthine. *Journal of Applied Physiology*, v. 94, n. 4, p. 1557-62, 2003.
- [8] MONJE et al. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nature Medicine*, v. 8, p. 955–962, 2002.
- [9] MONJE et al. Radiation injury and neurogenesis. *Current Opinion in Neurology*, v. 16, p. 129–134, 2003.
- [10] FUKUDA et al. Irradiation-induced progenitor cell death in the developing brain is resistant to erythropoietin treatment and caspase inhibition. *Cell Death & Differentiation*, v. 11, p. 1166-78, 2004.
- [11] LEBLOND, E. Étude Physiologique et thérapeutique de la caféine. O Doin, 1883.
- [12] FREDHOLM et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, v. 51, n. 1, p. 83–133, 1999.
- [13] CHEN et al. Impacts of methylxanthines and adenosine receptors on neurodegeneration: human and experimental studies. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 200, p. 267–310, 2011.
- [14] MADEIRA, M. H. Having a Coffee Break: The Impact of Caffeine Consumption on Microglia-Mediated Inflammation in Neurodegenerative Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2017.
- [15] CHEN et al. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 22, p. 301-311, 2008.
- [16] LAZARUS et al. Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 27, p. 10067–10075, 2011.
- [17] FREDHOLM et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, v. 51, n. 1, p. 83–133, 1999.
- [18] SIMÕES et al. Adenosine A2A receptors in the amygdala control synaptic plasticity and contextual fear memory. *Neuropsychopharmacology*, v. 41, n. 12, p. 2862–2871, 2016.
- [19] PACKER et al. A prospective study of cognitive function in children receiving whole-brain radiotherapy and chemotherapy: 2-year results. *Journal of Neurosurgery*, v. 70, p. 707-13, 1989.
- [20] MULHERN et al. Late neurocognitive sequelae in survivors of brain tumours in childhood. *The Lancet Oncology*, v. 5, p. 399-408, 2004.
- [21] RABER et al. Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiation Research*, v. 162, p. 39-47, 2004.
- [22] EDELSTEIN et al. Neurocognitive impact of cranial radiation in adults with cancer: an update of recent findings. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, v. 11, p. 32–37, 2017.