

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

CAFEÍNA REVERTE PREJUÍZO DA MEMÓRIA DECORRENTE DA IDADE COM  
MODIFICAÇÕES NO FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO ENCÉFALO

CÁSSIA SALLABERRY DE SOUZA

PORTO ALEGRE, 2012.

CÁSSIA SALLABERRY DE SOUZA

CAFEÍNA REVERTE PREJUÍZO DA MEMÓRIA DECORRENTE DA IDADE COM  
MODIFICAÇÕES NO FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO ENCÉFALO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Neurociências, como  
requisito para obtenção do título de  
Mestre em Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula

PORTO ALEGRE, 2012.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, amor, incentivo nas horas difíceis, por sempre acreditarem na minha capacidade e me ensinar a correr atrás dos meus sonhos com muita garra e determinação.

Ao Marcelo, que me acompanhou de perto em toda essa jornada, sempre me apoiando, incentivando, comemorando comigo os bons momentos e me apoiando nos momentos mais difíceis, por sempre tentar me ajudar mesmo sem entender quase nada de Neurociências, e por todo o amor, paciência e carinho.

A minha irmã e toda a minha família, que sempre me apoiaram e me incentivaram.

À professora Lisiane de Oliveira Porciúncula, que mesmo não me conhecendo aceitou prontamente me orientar e me recebeu de braços abertos no seu grupo de pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos, carinho e amizade, e por acreditar na minha capacidade.

À professora Elaine Elisabetsky, que graças a sua indicação cheguei à professora Lisiane, pelo incentivo de ir atrás do projeto que gostaria de realizar, e por sempre estar à disposição para me ajudar.

À Viviane de Moura Linck, colega e amiga, que sempre me socorreu nos momentos difíceis e me mostrou que nada é tão difícil quanto parece ser, e a todo o laboratório de Etnofarmacologia, pelo apoio e amizade.

Aos colegas de laboratório mais queridos que existem, que sem a amizade e parceria deles esse trabalho não seria possível: Ana Paula Ardais, Fernanda Nunes, Gabriela Fioreze, Marcelo Costa, Paulo Botton, Sabrina Mioranza, Professora Lisiane e demais colegas. Muito obrigado pelas risadas, ensinamentos, carinho e apoio. Com certeza vocês fizeram essa jornada parecer menos árdua e muito mais alegre.

Aos meus amigos, que compreenderam as minhas longas e frequentes ausências em nossos encontros, pelo apoio e incentivo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## APRESENTAÇÃO

Os resultados desta dissertação de mestrado estão apresentados sob a forma de um artigo científico. Essa dissertação é constituída por Introdução, Objetivos, Artigo Científico, Discussão, Conclusão, Referências Bibliográficas e Anexo. O item **1. Introdução** oferece o embasamento teórico necessário para a formulação dos objetivos e para o desenvolvimento da metodologia empregada nessa dissertação. O item **2. Objetivos** define a hipótese de trabalho e as estratégias metodológicas utilizadas. No item **3. Artigo Científico** encontra-se o artigo submetido (material e métodos, resultados e discussão dos resultados estão presente no artigo e representam a íntegra deste estudo). O item **4. Discussão** contém interpretações e comentários gerais pertinentes aos resultados apresentados no item 3, e aponta perspectivas para continuidade do trabalho. O item **5. Conclusão** apresenta as conclusões gerais. O item **6. Referências Bibliográficas** refere-se somente às citações que aparecem na introdução e discussão (referências bibliográficas que se referem a materiais e métodos, resultados e discussão parcial encontram-se no artigo do item 3). O item **7. Anexo** refere-se à tarefa comportamental que não está presente no artigo, a tarefa de reconhecimento de objetos, contendo uma breve introdução, bem como a descrição do resultado, discussão e referências bibliográficas utilizadas.

## SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Epidemiologia do Envelhecimento	5
1.2. Envelhecimento e Declínio Cognitivo	8
1.3. Doença de Alzheimer	11
1.4. Cafeína	12
1.5. Sistema Adenosinérgico	16
1.6. Fatores Neurotróficos	18
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. ARTIGO CIENTÍFICO	24
4. DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÃO	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
7. ANEXO: TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	88

## RESUMO

Os efeitos benéficos da administração crônica de cafeína sobre a memória têm sido observados em diferentes condições e modelos animais, mas os mecanismos subjacentes aos seus efeitos permanecem desconhecidos. Este estudo buscou investigar se a administração crônica de cafeína pode melhorar o desempenho em uma tarefa de memória em ratos adultos e de meia-idade. Além disso, os efeitos da cafeína sobre o imunoconteúdo do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foi analisado para estabelecer uma conexão entre os achados comportamentais e BDNF, uma das neurotrofinas estritamente envolvida na memória e processos de aprendizagem. Além disso, analisou-se o imunoconteúdo do receptor tirosina cinase (Trk B), o precursor do BDNF (proBDNF) e o fator de transcrição CREB. Ratos Wistar adultos (2 meses) e de meia-idade (12 meses de idade) receberam água ou cafeína (1 mg / mL) na água de beber durante 30 dias. Ambos os grupos foram submetidos às tarefas de avaliação da atividade locomotora e esquiva inibitória. Ratos de meia-idade apresentaram uma diminuição da atividade locomotora em relação aos adultos e o tratamento com cafeína não modificou esse parâmetro em nenhuma das idades. Na tarefa de esquiva inibitória, a memória de curta e longa duração foi avaliada. Ratos de meia-idade apresentaram um comprometimento total da memória de curta duração em relação aos adultos. Quando a memória de longa duração foi avaliada, os ratos de meia-idade apresentaram uma diminuição do seu desempenho em relação aos adultos, e tratamento de cafeína foi capaz de melhorar esse desempenho. Análise de *Western blot* do hipocampo de ratos tratados com cafeína revelou um aumento do imunoconteúdo de BDNF no hipocampo em ratos de meia-idade, um efeito atenuado pelo tratamento crônico de cafeína. Além disso, o tratamento com cafeína aumentou o imunoconteúdo de pro-BDNF e CREB em ambas as idades, e, ainda, foi encontrado um aumento do imunoconteúdo de CREB em ratos de meia-idade. O imunoconteúdo de TrkB diminuiu no hipocampo de ratos de meia-idade quando comparados aos adultos, e o tratamento com cafeína foi capaz de diminuir o imunoconteúdo de TrkB em ambas as idades. Os dados encontrados indicam uma estreita associação entre a modificação do desempenho da memória e imunoconteúdo BDNF. Portanto, nossos dados sugerem que a cafeína é capaz de normalizar o desempenho da memória durante o envelhecimento e pode estar relacionada à capacidade da cafeína de normalizar os níveis de BDNF.

Palavras-chaves: envelhecimento, cafeína, memória, BDNF, TrkB

## ABSTRACT

The beneficial effects of chronic caffeine administration in memory performance have been observed in different conditions and animal models but the underlying mechanisms remain unknown. This study was designed to investigate whether chronic caffeine administration could improve the performance in different memory tasks used in adult and middle-aged rats. In addition, the effects of caffeine on brain derived neurotrophic factor (BDNF) immunocontent was analyzed to establish a connection between the behavioral findings and BDNF, one of the neurotrophins strictly involved in memory and learning processes. Moreover, it was analyzed the immunocontent of tyrosine kinase receptor (Trk B), the precursor of BDNF (proBDNF) and the transcription factor CREB. Adult (2 months old) and middle-aged (12 months old) Wistar rats received either drinking water or caffeine (1 mg/mL) during 30 days. Both groups were submitted to open field and inhibitory avoidance tasks. Middle-aged rats presented decreased locomotor activity as compared to adults and caffeine was devoid of effect at any age. In the inhibitory avoidance task, short- and long-term memory was evaluated. Middle-aged rats presented impaired performance compared to adult ones for short-term memory. When long-term memory was evaluated, middle-aged rats showed a decreased in their performances compared to adult rats, and caffeine treatment was able to improve it. Western blot analysis of hippocampus from caffeine-treated rats revealed that BDNF increased by aging and caffeine treatment prevented it. In addition, caffeine treatment increased the pro-BDNF and CREB immunocontent in both ages. Furthermore, CREB densities increased with aging. TrkB immunocontent was decreased in the hippocampus from middle-aged rats when compared to adult ones, and caffeine decreased the density of TrkB in both ages. The present findings indicate a close association between the modification of memory performance and BDNF immunocontent. Therefore, our data suggest caffeine normalize memory performance upon aging and may be related to the ability of caffeine to normalize the levels of BDNF.

Keywords: aging, caffeine, memory, BDNF, TrkB.



## LISTA DE ABREVIATURAS

A<sub>1</sub> – Receptor metabotrópico de adenosina do subtipo A<sub>1</sub>

A<sub>2A</sub> – Receptor metabotrópico de adenosina do subtipo A<sub>2A</sub>

A<sub>2B</sub> – Receptor metabotrópico de adenosina do subtipo A<sub>2B</sub>

A<sub>3</sub> – Receptor metabotrópico de adenosina do subtipo A<sub>3</sub>

AMPC – Adenosina monofosfato cíclica

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo

CREB – proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPC

DA – Doença de Alzheimer

GABA – Ácido gama-aminobutírico

LTD – Depressão a longa duração

LTM – Memória de longa duração

LTP – Potenciação de longa duração

NGF – Fator de crescimento neuronal

NT – Neurotrofina

proBDNF – Forma precursora do BDNF

RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucléico mensageiro

SCH58261 – Antagonista A<sub>2A</sub>

SNC – Sistema nervoso central

STM – Memória de curta duração

TrkA – Receptor do tipo tirosina cinase A

TrkB – Receptor do tipo tirosina cinase B

TrkC – Receptor do tipo tirosina cinase C

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Epidemiologia do Envelhecimento

Desde 1960 começou a ser verificado um aumento na população de idosos no Brasil, fenômeno que continua crescendo de maneira muito rápida. De fato, de acordo com estimativas o Brasil entre os anos 1960-2025 passará da 16ª para a 6ª posição mundial em termos de número absoluto de indivíduos com 60 anos ou mais (Kalache et al., 1987; Nitrini, 1999). A proporção de idosos (com 65 anos ou mais) deverá aumentar de 5,1% em 2000 para 14,2% em 2050 (Chaimowicz, 1998; Nitrini, 1999). Essas mudanças são extremamente preocupantes, devido às ainda precárias condições econômicas e sociais dos idosos no Brasil (Nitrini, 1999). Essa tendência é na verdade um fenômeno mundial. Nos Estados Unidos, por exemplo, em 2000, 4,5% da população era de indivíduos com mais de 65 anos, e dez anos depois, essa proporção subiu para 5,1% (Figura 1).

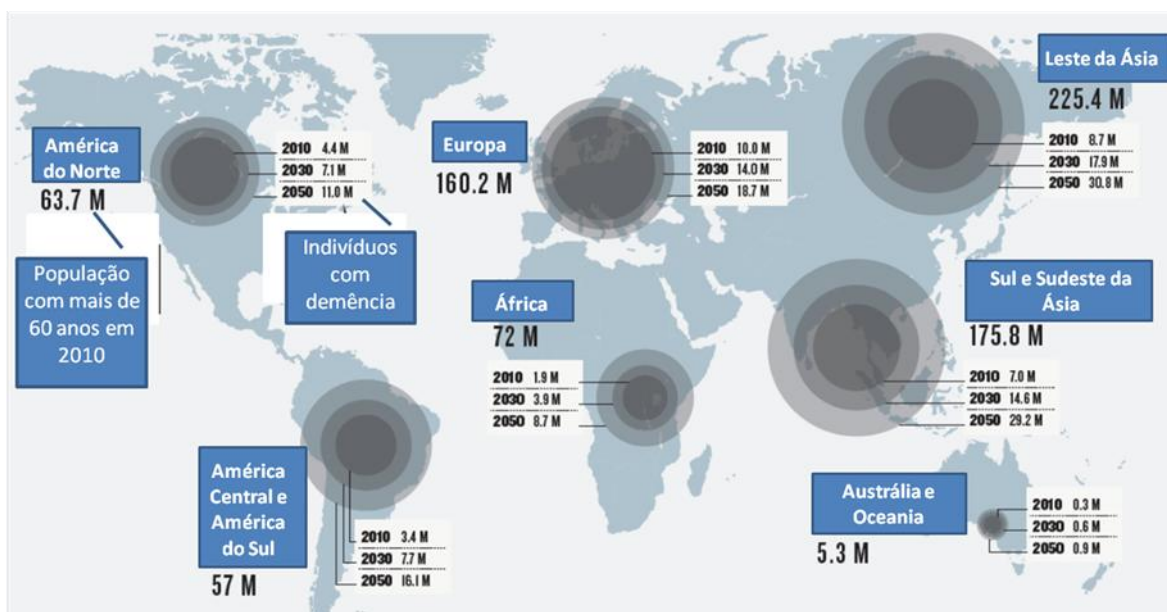


Figura 1: Estimativa mundial de demência (Abbot, 2011).

O aumento da expectativa de vida naturalmente vem acompanhado de um alto risco para o desenvolvimento de demências. Com a longevidade é esperado que na próxima década o número de pessoas com demência aumentará. Alguns estudos já anteciparam que o número de pessoas com demência duplicará a cada 20 anos, sendo 65,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050. A maior parte deste aumento será concentrada nos países em desenvolvimento (Abbot, 2011).

Em 2010, o impacto econômico global das demências foi de U\$ 604 bilhões de dólares. Baseado em dados demográficos, a *Alzheimer's Disease International* (ADI) – Federação das Associações de Alzheimer - estimou um aumento de 85% no custo em 2030, com os países em desenvolvimento tendo uma parte crescente do ônus econômico (Figura 2).

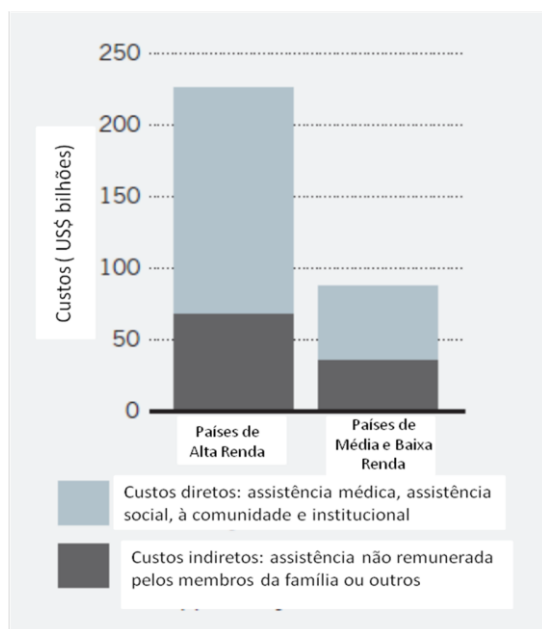


Figura 2: Custos globais com a demência. Há uma grande diferença no custo com cuidados de pessoas entre países de alta renda e de baixa e média renda países (Abbot, 2011).

Este número supera os custos de câncer ou doença cardíaca. O estudo *Dementia 2010*, encomendado pelo *UK Alzheimer's Research Trust*, estima que o custo anual nacional de demências foi de US\$ 38 bilhões, quase o dobro de câncer (US\$ 19 bilhões) e dos custos com doenças coronárias (US\$ 13 bilhões) e acidente vascular cerebral (US\$ 8 bilhões) (Figura 3).

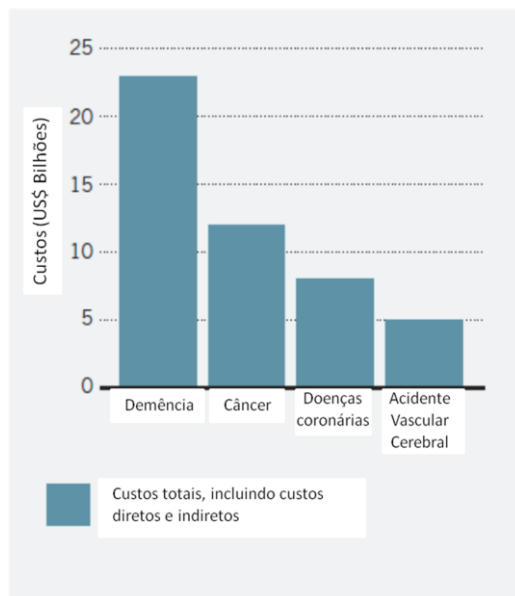


Figura 3: Comparando custos. No Reino Unido, o impacto econômico das demências supera os custos de outras doenças (Abbot, 2011).

Entretanto, a alocação de fundos públicos para pesquisa sobre estas doenças não reflete essa hierarquia. Em 2008, no Reino Unido, os gastos públicos com pesquisa sobre o câncer foram 12 vezes maiores do que os gastos com pesquisa sobre a demência. Nos Estados Unidos, o *National Institutes of Health* gasta 13 vezes com pesquisas sobre o câncer do que demências do tipo Alzheimer (Abbot, 2011).

Alguns países estão lançando programas para combater a demência em várias frentes. Por exemplo, em 2009, a Alemanha abriu o Centro Alemão para Doenças Neurodegenerativas (DZNE) em Bonn, com um custo de € 66 milhões (EUA \$ 95

milhões) por ano. A expectativa com esses programas é o esclarecimento sobre os mecanismos envolvidos nessas doenças bem como um maior entendimento sobre as suas manifestações clínicas, visando o desenvolvimento de estratégias preventivas e tratamentos mais eficazes (Abbot, 2011).

## **1.2. Envelhecimento e Declínio Cognitivo**

O estudo do envelhecimento busca entender as capacidades de mudança dos idosos como um processo normal de desenvolvimento. Dentro deste quadro, a neurobiologia do envelhecimento é um fator determinante importante (Gallagher e Rapp, 1997). No envelhecimento normal, as habilidades cognitivas tendem a declinar gradualmente, e o desenvolvimento de algum nível de comprometimento cognitivo é esperado com o avanço da idade (Erickson e Barnes, 2003). Com o aumento da expectativa de vida, preocupações surgem a respeito da qualidade de vida dos idosos, especialmente no seu bem-estar mental (Rosenzweig e Barnes 2003). Esta preocupação vai além das doenças que se tornam cada vez mais frequentes decorrentes da idade avançada, tais como a Doença de Alzheimer. Na verdade, a maioria das pessoas não sofrerá de condições demenciais, mas em vez disso, sofrerá de envelhecimento 'normal' (Crook et al., 1986; Rosenzweig e Barnes, 2003).

Muitos adultos se queixam de lapsos de memória à medida que envelhecem, e esses déficits de memória são chamados de “comprometimento de memória associado à idade”, que é uma condição prevalente com importantes custos sócio-econômicos nas sociedades modernas (Crook et al, 1986; Albert 2002; Rosenzweig e Barnes, 2003; Glisky 2007). Embora as mudanças na memória com a idade possam ser variáveis entre

os indivíduos, assim como os tipos de memória afetados, alterações na memória podem ser observados objetivamente, pelo menos, a partir da quinta década de vida, e muitos nessa faixa etária já notam mudanças sutis na memória. A compreensão de como ocorrem às mudanças no encéfalo durante o envelhecimento normal deve ser conhecido antes de ser plenamente compreendida a fronteira entre condições normais e patológicas (Albert, 2002). Portanto, o foco principal de muitas pesquisas é tentar distinguir os declínios de memória atribuíveis ao envelhecimento normal daqueles que são indicativos de envelhecimento patológico, como ocorre na doença de Alzheimer (Glisky 2007).

Até cerca de uma década atrás, pensava-se que o declínio na memória associado à idade era o resultado da perda neuronal no encéfalo, e que uma vez perdidas, essas células não poderiam ser substituídas (Albert, 2002; Erickson e Barnes, 2003). Além disso, pensava-se que os contatos sinápticos diminuía acentuadamente com a idade. Agora está claro que estes conceitos estão em grande parte incorretos. Por meio da utilização de combinações de técnicas (incluindo abordagens modernas para o estudo de tecidos *postmortem*, o uso de modelos animais inovadores, imagens do encéfalo vivo, e avaliações cognitivas cuidadosas), tem sido demonstrado que a perda neuronal relacionada à idade é muito menos extensa do que se pensava, e que alterações na estrutura e função sináptica são mais propensas a causar mudanças relacionadas à idade na memória (Albert, 2002).

Os dados mais relevantes pertencem aos estudos com ênfase no hipocampo, uma região do encéfalo essencial para os processos de aprendizado e memória. O número de evidências desses estudos permite concluir que o hipocampo apresenta uma mudança estrutural mínima com o avanço da idade (Squire e Zola, 1997). Estudos *postmortem* em

seres humanos e macacos indicam que a perda neuronal é surpreendentemente pequena na maioria dos subcampos do hipocampo. Por exemplo, o subiculum mostra uma perda significativa relacionada à idade em humanos, com uma tendência semelhante em macacos. No entanto, os subcampos CA1, CA2, CA3, bem como o córtex entorrinal, não mostram evidências de perda neuronal relacionada à idade (Morrison e Hof, 1997). Além disso, sabe-se agora da ocorrência de neurogênese no hipocampo, e tem sido sugerido que o número de neurônios no hipocampo é constante, mas com uma taxa de substituição fixa - a neurogênese, balanceada pela taxa de apoptose e remoção celular (Kornack e Rakic, 1999; Albert, 2002; Erickson e Barnes, 2003). Assim sendo, não só os neurônios não morrem em grande número como eles continuam a ser regenerados durante o envelhecimento, mas em menor proporção (Albert, 2002; Erickson e Barnes, 2003). Estudos em roedores têm demonstrado que, mesmo em animais que mostram declínio em uma tarefa de memória, não há diminuição do número de neurônios nos diversos subcampos do hipocampo (Albert, 2002). Além disso, existem dados comparáveis sobre perda neuronal no córtex, onde foi mostrado que perda neuronal não significativa nem tão extensa como os estudos anteriores sugeriam (Smith et al., 2000). Em vez disso, alterações na função axonal, mudanças na função sináptica e perda neuronal em núcleos subcorticais parecem ser em grande parte responsáveis pelo declínio de memória com a idade. Evidências em macacos indicam que as células da glia, particularmente os oligodendrócitos (responsáveis pela formação da bainha de mielina que envolve axônios), podem ser menos eficientes com o envelhecimento, sugerindo que alterações na mielina, ao invés de perda axonal, são pelo menos em parte, responsáveis pelas mudanças na substância branca que têm sido associadas com o declínio cognitivo associado à idade (Neilsen e Peters, 2000).



Há uma perda neuronal substancial em certas regiões subcorticais (por exemplo, o prosencéfalo basal, *locus coeruleus*, e substância nigra), o que resulta em diminuição da produção de uma variedade de neurotransmissores em numerosas regiões corticais importantes para a função da memória (Kemper, 1993). Também foi mostrado que roedores com déficits de aprendizagem espacial demonstraram alterações circuito-específicas na função sináptica entre o hipocampo e certas regiões corticais associados com a aprendizagem e memória (Smith et al., 2000). Tomados em conjunto, estes achados sugerem que as alterações na modulação do hipocampo e regiões corticais associadas são os principais responsáveis para alterações de memória com o avanço da idade entre os seres humanos saudáveis (West et al., 1994; Gallagher e Rapp, 1997; Albert, 2002).

### **1.3. Doença de Alzheimer (DA)**

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais freqüente de demência, caracterizada por uma deterioração progressiva das funções cognitivas (Cerpa et al., 2008), e sua prevalência aumenta progressivamente com a idade (Jorm, 1990; Nitrini, 1999), atingindo cerca de 10 % da população acima de 65 anos e quase 50% dos idosos com 85 anos ou mais (Smith et al., 2009). O envelhecimento da população, fenômeno que se restringia a países ricos, tem se generalizado, aumentando o risco das doenças degenerativas em todo o mundo, particularmente da DA. Ao passo que o aumento da longevidade deveria ser celebrado como uma conquista da sociedade moderna, existe essa preocupação com o aumento da incidência de doenças neurodegenerativas,

podendo se caracterizar em uma ameaça de epidemia para a qual a sociedade ainda não está preparada (Kalache, 1998; Nitrini, 1999).

A DA é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela deterioração progressiva da memória e outras habilidades cognitivas, perda progressiva de neurônios e sinapses, com a formação de placas senis compostas pelo peptídeo beta-amilóide e emaranhados neurofibrilares (Hashimoto et al., 2009; Peng et al., 2009; Selkoe, 1991).

Até o momento, apesar de muitos estudos mostrarem efeitos benéficos de alguns medicamentos sobre a cognição (ex: memantina, donepezil, rivastigmina) (Popp e Arlt, 2011; Salawu et al., 2011), não há tratamentos eficazes que possam curar ou impedir a progressão do comprometimento de memória associado à idade ou das doenças demenciais como o Alzheimer, o que enfatiza a importância da concepção e implementação de estratégias de prevenção primária, durante, ou antes, da meia-idade (Kivipelto et al, 2006; Eskelinen et al, 2009; Nooyens et al, 2011).

#### **1.4. Cafeína**

A cafeína é um alcalóide da família das xantinas encontrada naturalmente em plantas (Fredholm, 2011). Existem mais de 60 espécies de plantas que fornecem cafeína, sendo as mais conhecidas o café, chá, cacau, erva mate e guaraná. O conteúdo de cafeína presente em diversos produtos e bebidas depende da planta utilizada e do modo de preparo. A cafeína é provavelmente a substância psicoativa mais consumida no mundo. O consumo humano habitual de cafeína presente em alimentos e bebidas é estimado em uma faixa de 70-350 mg / pessoa / dia ou 5-8 mg / kg / dia (equivalente a 3

xícaras de café) (Chen et al., 2010). Estima-se que este consumo de cafeína atinja o pico de concentração plasmática de 0,25 a 2 mg / L (ou aproximadamente 1-10  $\mu$ M) e produz efeitos psicoestimulantes gerais, reduzindo a fadiga e melhorando o desempenho, com relativamente pouco risco de efeitos nocivos (Fredholm, 1999). No entanto, em doses mais elevadas (acima de 400-500 mg / dia), os efeitos da cafeína variam entre os indivíduos e pode levar a efeitos indesejados, incluindo aumento da ansiedade, aumento da pressão arterial, dor de cabeça e confusão (Chen, et al., 2010).

O principal mecanismo de ação da cafeína é o antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  (Quarta et al, 2004;.. Fredholm et al 1999). O bloqueio dos receptores de adenosina pela cafeína pode levar a efeitos secundários importantes sobre muitas classes de neurotransmissores, incluindo a noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, glutamato e GABA, que interferem em muitas funções fisiológicas (Fredholm et al., 1999).

Tem sido proposto que a cafeína atua na modulação das funções de aprendizagem e memória (Alhaider et al., 2011). Maia e de Mendonça (2002) demonstraram pela primeira vez, em um estudo caso-controle de pequeno porte, que pacientes diagnosticados com doença de Alzheimer haviam consumido significativamente menos cafeína durante 20 anos anteriores ao diagnóstico do que indivíduos da mesma faixa etária. Outro grande estudo prospectivo investigou a associação entre a ingestão de cafeína, o declínio cognitivo e a incidência de demência em uma amostra de indivíduos com 65 anos. Esse estudo demonstrou que a cafeína foi capaz de reduzir o declínio cognitivo em mulheres, sobretudo em idades mais avançadas (Ritchie et al. 2007). Recentemente, um estudo prospectivo investigou a associação entre o consumo de café e chá na meia-idade e o desenvolvimento de demência e

doença de Alzheimer em idade avançada (Eskelinen et al., 2009). Após um acompanhamento médio de 21 anos, consumidores de café na meia-idade apresentaram um menor risco de desenvolver demência e doença de Alzheimer em idade avançada, em comparação com aqueles que não bebiam ou bebiam pouco café. O risco mais baixo (65%) foi encontrado em pessoas que bebiam de 3-5 xícaras por dia. O consumo de chá era relativamente raro e não esteve associada com demência/doença de Alzheimer. Esses achados indicam que o consumo moderado de café na meia-idade está associado a uma diminuição do risco de demência e doença de Alzheimer em idade avançada (Eskelinen et al., 2009). Além disso, estudos longitudinais têm apontado que a ingestão diária de cafeína equivalente a três ou mais xícaras de café reduz o declínio cognitivo em indivíduos idosos (Jarvis, 1993; Johnson-Kozlow et al 2002).

Assim como humanos, roedores em idade avançada apresentam um declínio da função cognitiva relacionado à idade (Erickson e Barnes, 2003). Costa et al. (2008a) avaliaram os efeitos da administração de cafeína da idade adulta até o envelhecimento em camundongos usando a tarefa de reconhecimento de objetos. Este estudo demonstrou um desempenho inferior na memória de reconhecimento dos camundongos envelhecidos em comparação com os adultos e que o tratamento com cafeína durante 12 meses foi capaz de prevenir o comprometimento de memória.

Estudos em modelos celulares e animais da doença de Alzheimer também têm investigado a relação causal entre o efeito protetor da cafeína e a redução do declínio cognitivo em seres humanos (Fredholm 2011). Dall'Igna et al. (2003) demonstraram pela primeira vez em estudos *in vitro* o efeito neuroprotetor da cafeína na toxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide. Esse efeito foi mimetizado pela incubação com antagonista seletivo para receptores de adenosina  $A_{2A}$  (SCH 58261). Além disso, esse

efeito protetor foi comprovado em dois estudos com modelos experimentais *in vivo* em que a cafeína e antagonistas A<sub>2A</sub> preveniram o comprometimento de aprendizagem e de memória (Arendash et al., 2006; Dall'Igna et al., 2007). Estes achados estão de acordo com estudos farmacológicos que mostram que cafeína e antagonistas A<sub>2A</sub> revertem o comprometimento de memória induzida pelo envelhecimento e pela hipertensão espontânea (Prediger et al 2005; Prediger e Takahashi 2005; Fredholm 2011). Considerados em conjunto, esses dados indicam que o consumo de cafeína pode representar uma estratégia de prevenção em potencial para a demência e DA (Fredholm 2011).

Dados do nosso grupo revelaram que a administração de cafeína da idade adulta até o envelhecimento em camundongos foi capaz de prevenir o declínio da memória de reconhecimento associado à idade e o aumento do imunoconteúdo de BDNF e TrkB na tarefa de reconhecimento de objetos (Costa et al., 2008a). Além disso, a administração aguda de cafeína em camundongos adultos melhora o desempenho da memória de reconhecimento, juntamente com um aumento do imunoconteúdo de BDNF (Costa et al., 2008b). Outro estudo demonstrou que a administração crônica de cafeína preveniu o declínio cognitivo associado à idade em outras tarefas comportamentais (Prediger et al., 2005). No entanto, não há um estudo sobre os efeitos da administração crônica de cafeína sobre o declínio cognitivo associado à idade que avalie a memória emocional. Neste cenário, a cafeína surge como uma estratégia promissora, uma vez que normaliza o comprometimento da função da memória durante o envelhecimento e em diferentes condições neurodegenerativas (Jarvis, 1993; Angelucci et al., 1999; Angelucci et al., 2002; Prediger et al., 2005; Arendash et al., 2006; Dall'Igna et al., 2007; Costa et al., 2008a; Arendash et al., 2009; Cunha e Agostinho, 2010).

## 1.5. Sistema Adenosinérgico

A adenosina é considerada um neuromodulador endógeno, pois embora não possa ser armazenada em vesículas sinápticas como os neurotransmissores clássicos, ela exerce bastante influência em muitas funções no sistema nervoso central tais como o controle da liberação de neurotransmissores e da excitabilidade neuronal (Fredholm et al., 2005). Porém, a adenosina, por não ser um neurotransmissor clássico, não transfere informação unidirecionalmente do terminal pré-sináptico ao terminal pós-sináptico e não atua somente ou predominantemente nas sinapses (Cunha, 2001).

Tem sido proposto que a adenosina desempenha um papel fundamental na neuroproteção (Cunha 2005; Sebastião e Ribeiro, 2009; Stone et al., 2009). Até o presente momento, quatro diferentes subtipos de receptores de adenosina foram clonados e identificados em humanos e roedores:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$  sendo que todos os subtipos são acoplados a proteínas G (Fredholm et al, 2003; Sebastião e Ribeiro, 2009). Os receptores  $A_1$  e  $A_3$  estão acoplados a proteínas G inibitórias enquanto os receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  estão acoplados a proteínas G estimulatórias (Fredholm et al., 2001).

As ações da adenosina no SNC parecem ser mediadas principalmente pelos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , que possuem elevada afinidade pela adenosina e são altamente expressos em diversas regiões do cérebro. O receptor adenosinérgico do subtipo  $A_1$  é o mais abundante no SNC, principalmente na região do neocórtex, cerebelo, hipocampo e corno dorsal da medula espinhal, enquanto que os receptores do subtipo  $A_{2A}$  são altamente expressos em neurônios pálido-estriatais e no bulbo olfatório, mas também

são encontrados em outras regiões do cérebro, como no hipocampo (Fredholm et al., 2005).

Estudos *in vitro* demonstram que a cafeína possui afinidades semelhantes para os receptores de adenosina do subtipo A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> e uma baixa afinidade para o receptor do subtipo A<sub>3</sub> (Fredholm et al., 2001; Solinas et al., 2005). Como concentrações fisiológicas de adenosina podem estimular facilmente os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>, enquanto os receptores A<sub>2B</sub> somente são ativados com concentrações elevadas de adenosina, parece que os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> são os alvos preferenciais da cafeína no SNC.

A adenosina também parece modular os efeitos sobre a memória e aprendizagem, pois agonistas dos receptores de adenosina, principalmente A<sub>1</sub>, prejudicam a memória e aprendizagem em roedores (Homayoun et al., 2001; Normile e Barraco, 1991; Ohno e Watanabe, 1996; Zarrindast e Shafaghi, 1994), enquanto que o bloqueio não seletivo dos receptores de adenosina pela cafeína ou teofilina, assim como o bloqueio seletivo dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> facilitam a memória e aprendizagem nas tarefas de esQUIVA passiva (Kopf, 1999; Nehlig et al., 1992; Suzuki et al., 1993), esQUIVA inibitória (Pereira et al., 2002) e no labirinto aquático de Morris (Angelucci et al., 2002; Dudley et al., 1994; Hauber e Bareiss, 2001). Também tem sido demonstrado que antagonistas do receptor A<sub>2A</sub> podem prevenir a deterioração da memória que é verificada em animais idosos (Prediger et al., 2005) e em modelo experimental da doença de Alzheimer (Dall'Igna et al., 2007; Arendash et al., 2006).

Estudos anteriores demonstraram que os receptores de adenosina A<sub>2A</sub> podem mediar a neuroproteção pela potencialização das vias de sinalização operadas pelo fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e facilitar a modulação da transmissão

sináptica pelo BDNF em sinapses do hipocampo (Diógenes et al., 2004; Stone et al., 2009). Além disso, Lee e Chao (2001) demonstraram que os receptores  $A_{2A}$  são capazes de transativar os receptores TrkB e assim, deste modo, exercer um efeito trófico por meio do envolvimento de receptores tirosina cinase. Esses achados colocam os receptores  $A_{2A}$  numa posição chave na modulação dos efeitos dos fatores neurotróficos no encéfalo (Cunha 2005).

#### **1.6. Fatores Neurotróficos: fator neurotrófico derivado do encéfalo** **(*BDNF – brain-derived neurotrophic factor*)**

Os fatores neurotróficos são fundamentais em muitos aspectos para a função do sistema nervoso central, com papéis críticos na diferenciação celular, sobrevivência neuronal, migração, arborização dendrítica, sinaptogênese, e plasticidade sináptica (Pollock et al, 2001; Alonso et al, 2002; Silhol et al, 2008; Greenberg et al, 2009). Estas moléculas podem representar uma reserva fisiológica do organismo para combater o declínio cognitivo relacionado à idade (Silhol et al., 2008).

Os principais componentes da família de neurotrofinas, entre os mamíferos, são o fator de crescimento neuronal (NGF), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e NT-4/5. Todas as neurotrofinas são sintetizadas primeiramente na forma de pré-pró-neurotrofinas. O RNA mensageiro (RNAm) das neurotrofinas direciona a síntese da proteína nascente para o retículo endoplasmático, para que esta siga a via secretora. A proteína nascente é clivada no retículo endoplasmático dando origem às pró-neurotrofinas, que espontaneamente formam dímeros através de ligações não covalentes (Lessmann et al., 2003). Há três destinos



finais das proneurotrofinas intracelulares: a clivagem intracelular seguida de liberação; liberação seguida por clivagem extracelular; ou liberação sem clivagem subsequente (Lu et al, 2005). A clivagem das pró-neurotrofinas origina neurotrofinas designadas de maduras. Tanto as proneurotrofinas como as formas maduras das neurotrofinas atuam como moléculas sinalizadoras, contudo, com propriedades de sinalização distintas (Lee e Chao, 2001).

As funções das neurotrofinas resultam da ativação de distintos receptores de membrana: o receptor p75NTR (p75 *neurotrophin receptor*) e os receptores com atividade de cinase de tirosina da família Trk (*tropomyosin-related kinases*). Dentro dos receptores Trk, incluem-se os receptores TrkA, TrkB e TrkC. Ao contrário do receptor p75NTR ao qual se ligam todas as neurotrofinas com baixa afinidade, os receptores da família Trk têm maior afinidade e são seletivos para as diferentes neurotrofinas, sendo o TrkA o receptor de alta afinidade para o NGF, o TrkB para o BDNF e NT-4 e o TrkC para a NT-3 (Klein et al., 1990; Soppet et al., 1991; Lamballe et al., 1991). A combinação de NTs específicas com seus receptores inicia um processo de dimerização, transfosforilação dos resíduos de tirosina nos seus domínios citoplasmáticos e a ativação de cinases. Os resíduos fosforilados iniciam um processo de recrutamento de proteínas intracitoplasmáticas específicas com conseqüente modificação da expressão gênica, síntese protéica (Poo, 2001) e até mesmo apoptose celular (Chao, 2003).

O papel das NTs tem sido um tema relevante de pesquisas visto que, além da importância na manutenção da homeostasia do sistema nervoso central, alterações na sinalização mediada pelas neurotrofinas estão muitas vezes presentes em patologias neurodegenerativas, como na doença de Parkinson e de Alzheimer. Assim, o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares desencadeados pelas

neurotrofinas, bem como das suas alterações em situações patológicas é fundamental para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (Santos, 2009).

O estudo da expressão das neurotrofinas em neurônios tem dado importância especial ao fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) devido à sua capacidade de modulação da plasticidade sináptica. O BDNF participa da regulação não só da estrutura, mas também da função e manutenção da sobrevivência de algumas populações de neurônios durante o desenvolvimento e na vida adulta (Lu e Chow, 1999; Poo, 2001; Tyler e Pozzo-Miller, 2003). Os efeitos produzidos pelo BDNF podem variar conforme a fase do desenvolvimento. No início da fase fetal, o BDNF é importante para a formação e maturação dos neurônios em geral. Na fase adulta, tem papel fundamental no processo de consolidação da memória episódica (Barboza, 2009). Além disso, o BDNF também é essencial para eventos de plasticidade neuronal e funções importantes como o aprendizado e memória (Tyler et al., 2002). De fato, o bloqueio da sua sinalização compromete a persistência da memória (Alonso et al., 2002, 2005; Bekinschtein et al., 2007). Além disso, o BDNF é considerado essencial no mecanismo de formação de potenciação de longa duração (LTP), mecanismo essencial na aprendizagem e memória (Barboza, 2009).

Estudos em camundongos têm elucidado a importância do BDNF, principalmente através da remoção genética de uma cópia do gene que o codifica (modelos animais *knockout*). A supressão gênica completa do BDNF (BDNF *-/-*) impede o desenvolvimento do conceito além da fase embrionária. A depleção do BDNF após o nascimento ocasiona extrema dificuldade de aprendizado e memória e na vida adulta leva a diminuição da potenciação de longa duração (LTP - long-term potentiation) (Linnarsson et al, 1997).

O BDNF é amplamente expresso no hipocampo e no córtex cerebral maduro (Pollock et al, 2001; Greenberg et al., 2009). Modificação do imunoconteúdo do BDNF e/ou da expressão de seus receptores tem sido descrito durante o envelhecimento normal e na doença de Alzheimer, e uma diminuição na expressão de BDNF está associada à atrofia neuronal ou morte (Silhol et al, 2008; Tapia-Arancibia et al, 2008. ).

O BDNF é inicialmente sintetizado como um precursor, proBDNF, que sofre clivagem proteolítica pelo ativador de plasminogênio tecidual (tPA) mediada pela ativação da plasmina (Barnes and Thomas 2008; Yang 2009). A secreção de BDNF pode ocorrer de duas formas: 1) via constitutiva, no qual as vesículas contendo as neurotrofinas fundem-se espontaneamente com a membrana plasmática liberando assim o seu conteúdo ou 2) via regulada, onde as neurotrofinas são liberadas em resposta a determinados estímulos, como pelo aumento prolongado dos níveis intracelulares de cálcio ou pela atividade elétrica neuronal (Lessman et al., 2003).

Evidências sugerem que as proneurotrofinas têm efeitos biológicos opostos aos das neurotrofinas maduras. O proBDNF que não sofre clivagem liga-se ao receptor p75NTR e aumenta depressão de longa duração (LTD – long term depression) e leva a apoptose, enquanto que a ativação de TrkB por BDNF facilita a LTP, inibe a depressão LTD e também leva a sobrevivência neuronal (Lu et al ., 2005; Woo et al, 2005). Assim, a proteólise da forma precursora de BDNF torna-se um mecanismo de controle importante para a direção da plasticidade do hipocampo (Woo et al., 2005). A sinalização operada por BDNF é essencial para a manutenção e persistência do armazenamento da memória de longa duração avaliada na tarefa de esQUIVA inibitória (Bekinschtein et al, 2007;. 2008).

Os efeitos biológicos de BDNF são mediados principalmente pelo seu receptor de alta afinidade, o receptor tirosina cinase B (TrkB) (Chen e Weber, 2004). Através de um mecanismo de *splicing* alternativo, o RNAm do TrkB gera pelo menos três diferentes receptores com diferentes capacidades de sinalização: uma isoforma completa (TrkB *full-length*) e duas isoformas truncadas (TrkB *truncated* - TrkB.T1 e TrkB.T2). Somente a isoforma completa de TrkB possui o domínio intracelular tirosina cinase que, quando fosforilado, juntamente com a ligação do BDNF, inicia uma cascata de sinalização intracelular que promove a neuroproteção (Chen e Weber, 2004). Nas isoformas truncadas o domínio intracelular tirosina cinase não está presente, mas estas são capazes de desencadear sinais de transdução, resultando em diferentes respostas biológicas (Silhol et al., 2008). Evidências demonstram que os níveis de TrkB diminuem durante o envelhecimento (Croll et al, 1998; Silhol et al, 2005).

É amplamente aceito que a formação da memória de longa duração (LTM) exige a participação de uma ampla maquinaria transcricional e translacional nos sistemas neuronais (Izquierdo e Medina, 1997; Viola et al., 2000). Evidências sugerem que a ativação do fator de transcrição CREB (proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc), é um passo crucial para o estabelecimento de LTM (Viola et al., 2000). Além disso, o CREB é um importante mediador das respostas do BDNF (Finkbeiner et al., 1997), e é ativado no hipocampo durante o processo de aprendizagem (Alonso 2002; Finkbeiner 1997; Yamada e Nabeshima, 2003). Alterações da atividade CREB foram demonstradas em ratos envelhecidos (Asanuma et al., 1996).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Considerando o importante papel do BDNF no processo de memória e os efeitos positivos da cafeína sobre o desempenho de animais nas tarefas de aprendizagem e memória, buscou-se investigar se a administração crônica de cafeína poderia reverter o declínio cognitivo previsível associado à idade na memória de ratos de meia-idade com alterações relevantes no imunoconteúdo de BDNF, TrkB, proBDNF e CREB no hipocampo.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar os efeitos da idade e da administração de cafeína sobre a locomoção dos animais adultos e de meia-idade através da avaliação da atividade locomotora em arena de campo aberto;

2. Verificar os efeitos da idade e da administração de cafeína sobre o desempenho dos animais adultos e de meia-idade em tarefas de aprendizagem e memória, através das tarefas de reconhecimento de objetos e esQUIVA INIBITÓRIA;

3. Verificar a existência de um declínio na memória relacionada à idade nos ratos de meia-idade e se a administração oral de cafeína durante pode reverter esse declínio;

3. Verificar os efeitos da idade e da administração de cafeína sobre o imunoconteúdo hipocampal do BDNF, TrkB, proBDNF e CREB;

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

Chronic caffeine treatment affords a parallel normalization of memory performance and BDNF immunocontent in the hippocampus of middle-aged rats

Cássia Sallaberry, Fernanda Nunes, Marcelo S. Costa, Gabriela T. Fioreze, Ana Paula Ardais, Paulo Henrique S. Botton, Bruno Klaudat, Thomás Forte, Diogo O. Souza, Lisiane O. Porciúncula.

Laboratory of Studies on the Purinergic System, Federal University of Rio Grande do Sul, Health and Basic Sciences Institute, Department of Biochemistry, Porto Alegre/RS, Brazil – 90035 003.

Correspondence should be addressed to: Lisiane O. Porciúncula

Laboratory of Studies on the Purinergic System

Federal University of Rio Grande do Sul, Health and Basic Sciences Institute,

Department of Biochemistry, Rua Ramiro Barcelos, 2600-anexo

Porto Alegre/RS, Brazil – 90035 003.

## Abstract

The beneficial effects of chronic caffeine in memory performance have been observed in different conditions and animal models but the underlying mechanisms remain unknown. Since brain derived neurotrophic factor (BDNF) controls memory performance and is in turn controlled by the caffeine-operated adenosine modulation system, we now compared the ability of a chronic consumption of caffeine (1 mg/ml during 30 days) to affect memory performance, the hippocampal levels of precursor and BDNF, TrkB and CREB in adult and middle-aged (12 months old) rats. We found that middle-aged rats displayed impaired performance compared to adult ones for long-term memory assessed in the inhibitory avoidance task, and caffeine treatment was able to restore the performance in middle-aged rats. Notably, the hippocampal levels of BDNF were also increased in middle-aged rats, an effect attenuated by chronic caffeine consumption. In contrast, there was no correlation between the impact of age and caffeine treatment of the levels of proBDNF, TrkB or CREB. The present findings indicate a close association between the modification of memory performance and BDNF immunocontent. Therefore, our data suggest caffeine normalize memory performance upon aging and may be related to the ability of caffeine to normalize the levels of BDNF.

Key words: aging; caffeine; memory; BDNF; TrkB.



## Introduction

As the increase in life expectancy, concern arises regarding the quality of life available to the aged, especially in terms of mental well-being. This concern goes beyond the diseases that become increasingly common with old age, such as Alzheimer's disease. The mild memory deficits commonly experienced by aged people have been called age-associated memory impairment (AAMI; Crook et al., 1986; Rosenzweig and Barnes, 2003), which is a prevalent condition with important socio-economical costs in modern societies.

To date, there is no curative treatment to alleviate age-associated memory impairment or for dementing diseases, which emphasizes the importance of devising and implementing prevention strategies earlier in life, during or before the middle age (Kivipelto et al., 2006; Eskelinen et al., 2009; Nooyens et al., 2011). In this scenario, caffeine – a non-selective antagonist of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors (Fredholm, 1999; 2011) – has emerged as one such promising strategy, since it normalizes the impairment of memory function upon aging and in different neurodegenerative conditions (reviewed in Cunha & Agostinho, 2010).

Maia and de Mendonça (2002) first reported in a small case-control study that patients diagnosed for Alzheimer's disease had consumed markedly less caffeine during 20 years preceding the diagnosis than age-matched individuals. In another large population-based prospective study, caffeine reduced cognitive decline in women (Ritchie et al. 2007). In a prospective study, moderate coffee consumption at midlife was also associated with a decreased risk of dementia and AD in late-life (Eskelinen et al., 2009). Besides, longitudinal studies have reported that a daily caffeine intake equivalent to three or more cups of coffee reduces cognitive decline in “nondemented”

elderly subjects (Jarvis 1993; Johnson-Kozlow et al. 2002). Data from our group and others have already reported that chronic administration of caffeine prevented neurodegeneration and mnemonic deficits in experimental models of Alzheimer's disease and upon aging (Costa et al., 2008a; Dall'Ígna et al., 2003; 2007; Prediger et al., 2005).

Caffeine is the most widespread psychoactive substance in the world. It is generally accepted that its major central mechanism of action is counteraction of endogenous adenosinergic tone by competitive antagonism at  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors (Fredholm et al., 1999). Adenosine is an important modulator of the nervous system that acts via activation of G-protein-coupled receptors  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ , and  $A_3$  (Fredholm et al., 2003; Sebastiao and Ribeiro, 2009) and it has been proposed that adenosine plays a key role in neuroprotection (Cunha 2005). Previous studies reported that  $A_{2A}$  adenosine receptors can mediate neuroprotection by potentiating brain-derived neurotrophic factor (BDNF) survival signaling pathways (Stone et al., 2009) and facilitates BDNF modulation of synaptic transmission at hippocampal synapses (Assaife-Lopes et al., 2010; Diogenes et al., 2004). Moreover, adenosine via  $A_{2A}$  receptors is able to transactivate TrkB receptors and thus exerts a trophic effect through the engagement of tyrosine-kinase receptors (Lee and Chao, 2001). This places  $A_{2A}$  receptors in a key position to shut on and off the important effects of neurotrophins in the brain.

The neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its high-affinity receptor TrkB are highly expressed in the mature hippocampus and cerebral cortex, and they are essential in the regulation of neuronal survival and differentiation (Greenberg et al., 2009; Pollock et al., 2001). Modification of BDNF and/or the expression of its receptors have been described during normal aging and Alzheimer disease, and a

decrease in BDNF expression is associated with neuronal atrophy or death (Silhol et al., 2008; Tapia-Arancibia et al., 2008). It is important to emphasize that there is a controversy regarding age-related changes in the mRNA and immunocontent of BDNF in the hippocampus (Hattiangady et al., 2005; Kaisho et al., 1994; Katoh-Semba et al., 1998; Lapchak et al., 1993; Segovia et al., 2007; Silhol et al., 2005; 2007; Tapia-Arancibia et al., 2008). Likewise, several works have shown that changes in the mRNA levels are not necessarily correlated with protein content (Alonso et al., 2002; Pollock et al., 2001; Tyler et al., 2002).

BDNF is generated by the proteolytic cleavage of proBDNF by protease tissue plasminogen activator (tPA)-mediated activation of plasmin (Barnes and Thomas 2008; Yang 2009). There are three ultimate fates of intracellular proneurotrophins: intracellular cleavage followed by secretion; secretion followed by extracellular cleavage; or secretion without subsequent cleavage (Lu et al., 2005). Uncleaved proBDNF enhances long-term depression (LTD) through p75NTR and leads to apoptosis, whereas activation of TrkB by BDNF facilitates long-term potentiation (LTP) and inhibits long-term depression (LTD) and also leads to cell survival (Lu et al., 2005; Woo et al., 2005). Thus, proteolysis of the precursor form of BDNF becomes an important control mechanism for the direction of hippocampal plasticity (Woo et al., 2005). The signalling operated by BDNF is essential for maintenance and persistence of long-term memory storage assessed in the inhibitory avoidance task (Bekinschtein et al., 2007; 2008).

Data from our group revealed that adulthood administration of caffeine up to old age prevented age-associated recognition memory decline and increase in the BDNF and TrkB immunocontent (Costa et al., 2008a). Besides, acute administration of

caffeine in adult mice enhanced recognition memory along with increase in the BDNF immunocontent (Costa et al., 2008b). In addition, chronic administration of caffeine was described to prevent age-cognitive decline in other tasks (Prediger et al., 2005). However, there is no study focusing on the effects of chronic administration of caffeine in age-associated cognitive impairment evaluating emotional memory. Considering the important role of BDNF in the memory process and the reinforcing effects of caffeine on the performance of animals in learning and memory tasks, we sought to investigate whether chronic administration of caffeine could counteract the predictable age-associated memory decline in middle-aged rats with relevant changes in the hippocampal BDNF, TrkB, proBDNF and CREB immunocontent.

## **Material and Methods**

### **Animals**

Adult (2 months old) and middle-aged (12 months old) male Wistar rats were used in the present study. These rats were obtained from our breeding colony. All experimental procedures were performed according to the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals and to the Brazilian Society for Neuroscience and Behaviour recommendations for animal care. The animals were housed five to a cage with food and water ad libitum and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). All behavioral tests were performed between 8:00 a.m. and 5:00 p.m.

### **Caffeine administration**

Adult and middle-aged rats received either caffeine solution or drinking water during 30 days. Accordingly to previous reports caffeine solution (1 mg/mL) was daily replaced in the water bottles and this dose corresponds to a moderate intake (Fredholm et al., 1999). To avoid disruptions on the circadian cycle caffeine solution was replaced between 6:00 and 7:00 pm. Caffeine treatment was not interrupted during behavioral tasks.

#### Locomotor activity analysis

The open field test is widely used for assessing locomotor and exploratory activities. The apparatus consisted of a black-painted Plexiglas measuring 50 cm × 50 cm and was surrounded by 50 cm high walls. The experiments were conducted in a sound-attenuated room under low-intensity light. Each rat was placed in the center of the arena and the distance traveled was recorded during 5 min. The experiment was recorded with a video camera positioned above the arena and monitored in an adjacent room by an observer blind to the treatment of the animals. The analysis was performed using a computer-operated tracking system (Any-maze, Stoelting, Woods Dale, IL).

#### Inhibitory Avoidance Task

The inhibitory avoidance task was assessed in an apparatus consisted of an acrylic box (50 cm × 25 cm × 25 cm) whose floor contains parallel caliber stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. The left end of the grid was occupied by a 7-cm wide, 2.5 cm high formica platform. In the training session, rats were placed on the platform and the latency to step-down onto the floor with the four paws was measured with an automatic device; immediately after stepping-down rats received a 0.5

mA, 2 s footshock. After they had received the footshock, rats were immediately placed in their home cage. The test session was carried out 90 min after training for short-term memory (STM) or 24 h after training for long-term memory (LTM). No footshock was given in the test session, and step-down latencies (180 s ceiling) were taken as a measure of retention. The same animal was tested for STM and LTM. The reminder effect that could affect LTM was ruled out by previous reports, in which repeated nonreinforced testing during the first 4.5 hours after training did not lead to extinction (Cammarota et al., 2007).

### Immunoblotting

After behavioral tasks, rats were sacrificed by decapitation; the whole hippocampus was dissected out and immediately homogenized in 5 % SDS with a protease inhibitor cocktail. The homogenate was frozen and kept at -70 °C. After defrosting, the protein content was determined by using bicinchoninic acid assay and bovine serum albumin (BSA) as standard (BCA from Pierce, São Paulo/Brazil). Hippocampal extracts were diluted to a final protein concentration 2 µg/µl in SDS-PAGE buffer and 80 µg (pro-BDNF and BDNF), 40 µg (for CREB and TrkB) of protein and dualcolor prestained molecular weight standards were separated by SDS-PAGE. BDNF and proBDNF were separated at 14 % resolving gel; TrkB and CREB at 8 % and all samples run at 4 % concentrating gel. After electro-transfer, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with Tris-buffered saline 0.1 % Tween-20 (TBS-T) containing 5 % BSA. After blocking, the membranes were incubated overnight at 4° C with mouse anti-BDNF antibody (1: 1000, Sigma, São Paulo, Brazil), mouse anti-pro-BDNF antibody (1: 500, Sigma, São Paulo, Brazil), or with rabbit anti-TrkB antibody

(1: 1000; Upstate Cell Signalling, São Paulo/Brazil), rabbit anti-CREB (1: 1000, Cell Signaling, São Paulo/Brazil). As an additional control of the protein loading, membranes were incubated with mouse anti- $\beta$ -actin antibody (1: 2000; Santa Cruz, São Paulo/Brazil), mouse anti- $\beta$ -tubulin (1: 3000; Santa Cruz, São Paulo/Brazil) or mouse anti-GAPDH (1: 2000; Chemicon, São Paulo/Brazil). Membranes were also stained with Ponceau S. After primary antibodies incubation, membranes were washed and incubated with horseradish-peroxidase conjugated secondary antibodies for 1-2 h at room temperature and developed with ECL kit (Amersham, São Paulo/Brazil). The autoradiographic films were scanned and densitometric analyses were performed using public domain NIH Image Program (developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

#### Statistical analysis

For the differences found in the open field arena and immunoblotting data were analyzed using two-way ANOVA with treatment versus age as factors. For the inhibitory avoidance task since some animals reached the ceiling of 180 s and the data distribution did not follow Gaussian curve a non-parametric analysis was chosen. Thus, the step-down latencies were expressed as medians (interquartile ranges) and differences between training and test latencies were analyzed by using Wilcoxon test. Kruskal–Wallis followed by Dunn's Multiple comparison test was used to compare treatments. Graphpad Prism 5 was the software used and significant differences were considered when  $P < 0.05$ .

## Results

The general locomotor activity of rats according to the treatment was recorded during five minutes in an open field arena. The traveled distance in meters recorded during 5 min was not significantly different between treatments (Fig. 1). However, two-way ANOVA revealed only a significant effect of age. Thus, middle-aged rats presented a decrease in their locomotor activity compared to adults independent of the treatment [ $F(1,57) = 25.33; P < 0.0001$ ] (Fig. 1).

In the step-down inhibitory avoidance task, short- and long-term memory was assessed (90 min and 24 h after training, respectively) (Fig. 2). The treatment with caffeine did not modify the performance of adult rats when both short- and long-term memory were assessed (Fig. 2). Middle-aged animals presented a fully impairment in the performance of the inhibitory avoidance task for short-term memory. For long-term memory, the latencies between training and test were statistically significant, but the performance was worsened compared to adult animals (Fig. 2). Middle-aged rats that received caffeine in the drinking water presented similar performance to adult animals for STM and LTM (Fig. 2).

Immunoblotting analysis for pro-BDNF, BDNF, TrkB and CREB was carried out in the whole hippocampus from adult and middle-aged rats. Analysis of BDNF immuncontent revealed a significant effect of age [ $F(1,31) = 5.98; P = 0.0203$ ], treatment [ $F(1,31) = 4.61; P = 0.0396$ ] and interaction [ $F(1,31) = 4.17; P = 0.0497$ ] (Fig. 3A). Middle-aged rats presented an increase in the BDNF immunocontent (50 %) compared to adult ones. Caffeine treatment counteracted BDNF immunocontent at similar levels observed for adult animals (Fig 2A). For proBDNF, statistical analysis revealed only a significant effect of treatment [ $F(1,34) = 16.30; P = 0.0003$ ] (Fig. 3B).



Caffeine was able to increase proBDNF immuncontent in adult as well as in middle-aged rats.

The immunocontent of TrkB was also analyzed in whole hippocampus. Two-way ANOVA revealed a significant effect of age [ $F(1,22) = 6.35$ ;  $P = 0.0195$ ] and treatment [ $F(1,22) = 4.43$ ;  $P = 0.0470$ ]. TrkB immunocontent was decreased in the hippocampus from middle-aged rats (25 % compared to adult rats) and caffeine treatment equally decreased the immunocontent in both ages (Fig. 3C). Finally, the immunocontent of the transcription factor CREB (cAMP-response element binding protein) was detected in the hippocampus from adult and middle-aged rats that received drinking water or caffeine (1 mg/mL). Statistical analysis revealed that the immunocontent of CREB was increased upon aging [ $F(1,24) = 12.84$ ;  $P = 0.0015$ ] and caffeine promoted an increase in the CREB immunocontent in both ages [ $F(1,24) = 5.91$ ;  $P = 0.0229$ ] (Fig. 3D). The representative bands from each protein immunoblotted are displayed in the Figure 3E.

## Discussion

In this study, the effects of a chronic administration of caffeine in adult and middle-aged animals were evaluated in the inhibitory avoidance task. Besides, the immunocontent of pro-BDNF, BDNF, TrkB and CREB were assessed in the hippocampus. As previously reported, middle-aged animals present a decrease in the locomotor activity compared to adult rats (Costa et al., 2012; Agafonova et al., 2001; Stefanova et al., 2010). The chronic treatment with caffeine did not modify the age-related decrease in the locomotor activity. Thus, any effect of the caffeine on memory could not be related to alterations in the locomotor activity.

In this study, middle-aged rats displayed impairment in the short-term memory and a worsened long-term memory. Differences in the magnitude of age-associated memory deficits have been reported for some tasks used to evaluate learning and memory (Bergado et al., 2011). Recent report found a fully impairment in the inhibitory avoidance task when LTM was assessed for middle-aged rats (12 month old) (Moretti et al., 2011). Differently from our study, only LTM was assessed and those animals presented a fully impairment in the long-term memory. Probably due to methodological differences in the paradigm of inhibitory avoidance, middle-aged rats displayed a worsened but not a full impairment in the LTM. In fact, the intensity of footshock applied was higher than in the aforementioned study and differently from a weak footshock, the strong footshock persists over time (Rossato et al., 2009).

In contrast to that observed for adult animals, short and long-term memory impairments displayed by middle-aged rats were prevented by chronic treatment with caffeine. It is no surprising because caffeine had promoted enhancement in the performance of some tasks used to evaluate memory only in an acute manner (Angelucci et al., 1999; Botton et al., 2010; Costa et al., 2008b). Although evidences from previous studies have supported the cognitive enhancer properties of caffeine in a variety of behavioral tasks that evaluated learning and memory in rodents (Angelucci et al., 1999; Castellano, 1976; Costa et al., 2008b; Kopf et al., 1999; Roussinov and Yonkov, 1976), we did not find differences between caffeine-treated adult rats as compared to control group. However, in most of the cases, the administration of caffeine was usually performed in an acute manner (Costa et al., 2008b; Leite et al., 2011; Prediger et al., 2005) and it should be taken into account that additional tolerance of caffeine that develops to many of its behavioral effects after chronic administration

(Karcz-Kubich et al., 2003). It is known the ability of prolonged caffeine treatment to desensitize  $A_1$  receptor-mediated responses while increasing the ability of caffeine to block  $A_{2A}$  receptors (Dall'Igna et al., 2007; Karcz-Kubicha et al., 2003; Quarta et al., 2004), and this mechanism might be related to the differences between acute and chronic caffeine treatments. However, the reversal of age-related memory impairment is in agreement with previous reports by our group and others using different tasks for recognition memory, olfactory discrimination and social preference memory assesment (Costa et al., 2008; Leite et al., 2011; Prediger et al., 2005). From our knowledge, this is the first report in which beneficial effects of chronic caffeine treatment orally administered were described in middle-aged rats trained in the inhibitory avoidance task. This task is widely used to assess different types of memory after an aversive stimulus, being a form of learning that engages several sensory stimuli including spatial and visual perception, sensitivity to pain, and emotional, fear-driven components (Camarota et al., 2007).

We have previously demonstrated that BDNF increases in the hippocampus from aged-mice, and caffeine treatment prevented this age-associated increase (Costa et al., 2008a). In this study, middle-aged animals also presented an increase in the BDNF along with CREB, but no age-related modifications in the proBDNF immunocontent was observed. Accordingly to a recent report, hippocampal proBDNF was not modified upon aging (Oblang et al., 2011), but caffeine promoted its increase in adult as well as in middle-aged animals. The pro-region of neurotrophins may play a critical role in their synaptic targeting and activity-dependent secretion at synapses (Lu et al., 2005). Endogenous proBDNF is rapidly converted to BDNF, which promotes synaptic potentiation, suggesting a bidirectional regulation of synaptic plasticity by proBDNF

and mature BDNF (Woo et al., 2005). Because p75NTR can be dynamically regulated under damage in the CNS, a plausible function of proneurotrophins is also to eliminate damaged cells that express p75NTR (Lu et al., 2005). The balance between cell survival and cell death might depend upon the proportions of mature and proneurotrophin. In this context, even though the increase in the proBDNF caused by caffeine in adult rats have not been related to behavioural alterations, in middle-aged animals it could be an early increase to minimize any further age-associated damage in the hippocampus. Likewise, the age-induced increase in BDNF may be also an early signal to rescue the hippocampus from many age-related morphological changes, such as synaptic loss followed by neuronal death, reductions in spine densities, diminished dentate neurogenesis as early as middle age and reduced persistence of long-term potentiation (LTP) in hippocampal synapses, which likely contribute to age-related learning and memory impairments (Barnes and McNaughton, 1985; Erickson and Barnes, 2003; Halbach, 2010; Hattiangady et al., 2005; Jolitha et al., 2009). The lack of correlation between proBDNF of BDNF changes may also reflect an increased turnover of BDNF protein or may be the lack of translation of the newly synthesized mRNA, suggesting that the BDNF gene is regulated at the level of translation as well as transcription. Alternatively, experience-dependent changes in protein BDNF trafficking may account for this discrepancy between BDNF and proBDNF (Alonso et al., 2002; Pollock et al., 2001). Importantly, significant age-related decreases in the TrkB receptor were detected in the hippocampus, which is in agreement with previous reports (Croll et al., 1998; Silhol et al., 2005, 2008). It is most likely that the age-related loss of TrkB had contributed to the age-related disruptions of memory presented by middle-aged rats (Croll et al., 1998). After ligand binding, TrkB receptors are generally internalized and

then rapidly degraded (Silhol et al., 2008). The decrease immunoccontent of this receptor might probably be associated with biochemical modifications that occur during aging, i.e. glycation, and carbonylation, that technically prevents its recognition by the antibody and possibly by the ligand (Silhol et al., 2008; Tapia-Arancibia et al., 2008). In fact, the ability of BDNF to downregulate TrkB has been reported (Binder et al., 2001; Chen and Weber, 2004; Knusel et al., 1997) and this down-regulation may result from dysfunction in the TrkB receptor itself or in the components of the TrkB signaling pathway (Tsai, 2004). Thus, it would be reasonable to speculate that the age-related increase in BDNF levels led to TrkB downregulation and reduced responsiveness, an effect normalized by caffeine treatment that promoted a positive impact on learning and memory. Along with BDNF, aging also increased CREB immunoccontent as well as caffeine treatment. Alterations of the CREB activity have been documented in aged-rats (Asanuma et al., 1996). CREB is a transcriptional factor strictly involved in the LTM formation, being activated in the hippocampus during the learning process (Alonso 2002; Finkbeiner 1997; Viola et al., 2000; Yamada and Nabeshima, 2003). CREB is considered the major mediator of neuronal BDNF responses (Finkbeiner et al., 1997) and its increase observed by the treatment with caffeine could contribute for the positive effects on memory found in this study. Altogether, these findings extend previous study about the potential of caffeine in reversing age-cognitive decline with participation of BDNF-mediated signalling pathways.

## **Conclusion**

The occurrence of dementia is rising substantially worldwide. The pathological processes that lead to dementia start decades before the clinical manifestation of the

disease (Kivipelto et al., 2006; Eskelinen et al., 2009; Nooyens et al., 2011). Our study showed that a usual diet component that is frequently consumed around the world appears to reverse the early age-related decline in the emotional memory. It is important to know benefits of a usual diet component as a low-cost and simple strategy for the improvement of the life quality of elderly people. This finding opens a possibility that dietary interventions might improve the life quality of elderly people. Finally, these benefits of caffeine were related to modifications in BDNF, an important neurotrophic factor strictly involved in memory processes.

### **Acknowledgements**

This work was supported by PRONEX and PRONEM (FAPERGS/CNPq), INCT-Excitotoxicity and Neuroprotection. Bruno Klaudat is a fellowship from PIBIC/CNPq and Thomas Forte from PROBIC/FAPERGS.

### **References**

- Agafonova, I. G., Kolosova, N. G., Mishchenko, N. P., Chaikina, E. L., Stonik, V. A., 2007. Effect of histochrome on brain vessels and research and exploratory activity of senescence accelerated OXYS rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 143, 467–471.
- Alonso, M., Vianna, M. R., Depino, A. M., Mello e Souza T., Pereira P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., Medina, J. H., 2002. BDNF-Triggered Events in the Rat Hippocampus Are Required for Both Short- and Long-Term Memory Formation. *Hippocampus.* 12, 551-560.

Angelucci, M. E., Vital, M. A., Cesário, C., Zadusky, C. R., Rosalen, P. L., Da Cunha C., 1999. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. *Euro. J. Pharmacol.* 373, 135–140.

Asanuma, M., Nishibayashi, S., Iwata, E., Kondo, Y., Nakanishi, T., Gomez, M., Ogawa, N., 1996. Alterations of cAMP response element-binding activity in the aged rat brain in response to administration, of rolipram, a cAMP-specific phosphodiesterase inhibitor. *Mol. Brain. Res.* 41,210–215.

Assaife-Lopes, N., Sousa, V. C., Pereira, D. B., Ribeiro, J. A., Chao, M. V., Sebastião, A. M., 2010. Activation of adenosine A<sub>2A</sub> receptors induces TrkB translocation and increases BDNF-mediated phospho-TrkB localization in lipid rafts: implications for neuromodulation. *J. Neurosci.* 30, 8468-8480.

Barnes, C. A., McNaughton, B. L., 1985. An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to longterm enhancement of hippocampal synapses. *Behav. Neurosci.* 99, 1040–1048.

Barnes, P., Thomas, K. L., 2008. Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. *PLoS. ONE.* 3, e3248.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J. H., 2007. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron.* 53, 261–277.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katze, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., Izquierdo, I., Medina, J. H., 2008. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105, 2711-2716.

Bergado, J. A., Almaguer, W., Rojas, Y., Capdevila, V., Frey, J. U., 2011. Spatial and emotional memory in aged rats: a behavioral-statistical analysis. *Neuroscience*. 172, 256-269.

Binder, D. K., Croll, S.D, Gall, C. M., Scharfman, H. E., 2001. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends. Neurosci.* 24, 47-53.

Costa, M. S., Botton, P. H., Mioranza, S., Ardais, A. P., Moreira, J. D., Souza, D. O., Porciuncula, L. O., 2008a. Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunocontent in the hippocampus. *Neurochem. Int.* 53, 89-94.

Costa, M. S., Botton, P. H., Mioranza, S., Ardais, A. P., Moreira, J. D., Souza, D. O., Porciuncula, L. O., 2008b. Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunocontent in the hippocampus. *Neurochem. Int.* 53, 89–94.

Costa, M. S., Ardais, A. P., Fioreze, G. T., Mioranza, S., Botton, P. H., Portela, L. V., Souza, D. O., Porciuncula, L. O., 2012. Treadmill running frequency on anxiety and hippocampal adenosine receptors density in adult and middle-aged rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 36, 198-204.

Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Medina, J. H., Izquierdo, I., 2007. Studies of short-term avoidance memory. In: Bermúdez-Rattoni F, editor. *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Boca Raton (FL): CRC Press; Chapter 10. *Frontiers in neuroscience*.

Castellano, C., 1976. Effects of caffeine on discrimination learning, consolidation, and learned behavior in mice. *Psychopharmacology (Berlin)*. 48, 255–260.



Chen, H., Weber, A. J., 2004. Brain-derived neurotrophic factor reduces TrkB protein and mRNA in the normal retina and following optic nerve crush in adult rats. *Brain. Res.* 1011, 99-106.

Croll, S. D., Ip, N. Y., Lindsay, R. M., Wiegand, S. J., 1998. Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain. Res.* 812, 200–208.

Crook, T., Bartus, R. T., Ferris, S. H., Whitehouse, P., Cohen, G. D., Gershon, S., 1986. Age-associated memory impairment: proposed diagnostic criteria and measures of clinical change. Report of a National Institute of Mental Health Work Group. *Dev. Neuropsychol.* 2, 261–276.

Cunha, R. A., 2005. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A<sub>1</sub> receptor activation to A<sub>2A</sub> receptor blockade. *Purinergic Signalling* 1, 111–134.

Dall’Igna, O. P., Porciuncula, L. O., Souza, D. O., Cunha, R. A., Lara, D. R., 2003. Neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor blockade of beta amyloid neurotoxicity. *Br. J. Pharma.* 138,1207-1209.

Dall’Igna, O. P., Fett, P., Gomes, M. W., Souza, D. O., Cunha, R. A., Lara, D. R., 2007. Caffeine and adenosine A2A receptor antagonists prevent beta amyloid (25-35) induced cognitive deficits in mice. *Exp. Neurol.* 203,241-245.

de la Tremblaye, P. B., Plamondon, H., 2011. Impaired conditioned emotional response and object recognition are concomitant to neuronal damage in the amygdala and perirhinal cortex in middle aged ischemic rats. *Behav. Brain. Res.* 219, 227-33.

Diogenes, M. J., Fernandes, C. C., Sebastiao, A. M., Ribeiro, J. A., 2004. Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 24, 2905-2913.

- Erickson, C. A., Barnes, C. A., 2003. The neurobiology of memory changes in normal aging. *Experimental Gerontology*. 38, 61–69.
- Eskelinen, M. H., Ngandu, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., Kivipelto, M., 2009. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE Study. *Journal of Alzheimer's Disease*. 16, 85–91.
- Finkbeiner, S., Tavazoie, S., Maloratsky, A., Jacobs, K., Harris, K., Greenberg, M., 1997. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*. 19,1031–1047.
- Fredholm, B. B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A., Zvartau, E. E., 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51, 83-133.
- Fredholm, B. B., Cunha, R., Svenningsson, P., 2003. Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 413-426.
- Fredholm, B. B., 2011. Methylxanthines. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 200, 268-293.
- Glisky, E. L., 2007. Changes in Cognitive Function in Human Aging. In: Riddle DR, editor. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. Boca Raton (FL): CRC Press; *Frontiers in Neuroscience*: Chapter 1.
- Greenberg, M. E., Xu, B., Lu, B., Hempstead, B. L., 2009. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J. Neurosci.* 29, 12764-12767.
- Halbach, O. B., 2010. Involvement of BDNF in age-dependent alterations in the hippocampus. *Front. Aging. Neurosci.* 2, 1-11.

Hattiangady, B., Rao, M. S., Shetty, G. A., Shetty, A. K., 2005. Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. *Exp. Neurol.* 195, 353-371.

Jarvis, M. J., 1993. Does caffeine intake enhance absolute levels of cognitive performance? *Psychopharmacology.* 110, 45-52.

Johnson-Kozlow, M., Kritz-Silverstein, D., Barrett-Connor, E., Morton, D., 2002. Coffee consumption and cognitive function among older adults. *Am. J. Epidemiol.* 156, 842-850.

Jolitha, A. B., Subramanyam, M. V., Asha-Devi, S., 2009. Age-related responses of the rat cerebral cortex: influence of vitamin E and exercise on the cholinergic system. *Biogerontology.* 10, 53-63.

Kaisho, Y., Miyamoto, M., Shiho, O., Onoue, H., Kitamura, Y., Nomura, S., 1994. Expression of neurotrophin genes in the brain of senescence-accelerated mouse (SAM) during postnatal development. *Brain. Res.* 647, 139-144.

Karcz-Kubicha, M., Antoniou, K., Terasmaa, A., Quarta, D., Solinas, M., Justinova, Z., Pezzola, A., Reggio, R., Müller, C. E., Fuxe, K., Goldberg, S. R., Popoli, P., Ferré, S., 2003. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. *Neuropsychopharmacology.* 28, 1281-1291.

Katoh-Semba, R., Semba, R., Takeuchi, I. K., Kato, K., 1998. Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neurosci. Res.* 31, 227-234.

Kivipelto, M., Ngandu, T., Laatikainen, T., Winblad, B., Soininen, H., Tuomilehto, J., 2006. Risk score for the prediction of dementia risk in 20 years among middle aged people: a longitudinal, population-based study. *Lancet. Neurol.* 5, 735-741.

Knusel, B., Gao, H., Okazaki, T., Yoshida, T., Mori, N., Hefti, F., Kaplan, D. R., 1997. Ligand-induced down-regulation of Trk messenger RNA, protein and tyrosine phosphorylation in rat cortical neurons. *Neuroscience* 78, 851-862.

Kopf, S. R., Melani, A., Pedata, F., Pepeu, G., 1999. Adenosine and memory storage: effect of A(1) and A(2) receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berlin)* 146, 214–219.

Lapchak, P. A., Araujo, D. M., Beck, K. D., Finch, C. E., Johnson, S. A., Hefti, F., 1993. BDNF and trkB mRNA expression in the hippocampal formation of aging rats. *Neurobiol. Aging* 14, 121–126.

Lee, F. S., Chao, M.V., 2001. Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 3555–3560.

Leite, M. R., Wilhelm, E.A., Jesse, C. R., Brandão, R., Nogueira, C. W., 2011. Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. *Exp. Gerontol.* 46, 309-315.

Lu, B., 2003. Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron* 39, 735–738.

Lu, B., Pang, P. T., Woo, N. H., 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev. Neurosci.* 6, 603-14.

Maia, L., de Mendonca, A., 2002. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur. J. Neurol.* 9, 377-382.

Miller, L. P., Hsu, C., 1992. Therapeutic potential for adenosine receptor activation in ischemic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 9, S563–577.

Moretti, M., de Souza, A.G., de Chaves, G., de Andrade, V. M., Romao, P. R., Gavioli, E. C., Boeck, C. R., 2011. Emotional behavior in middle-aged rats: Implications for geriatric psychopathologies. *Physiol. Behav.* 102, 115-120.

Nooyens, A. C. J., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Boxtel, M. P. J., van Gelder, B. M., Verhagen, H., Verschuren, W. M. M., 2011. Fruit and vegetable intake and cognitive decline in middle-aged men and women: the Doetinchem Cohort Study. *British Journal of Nutrition* 106, 752-761.

Obiang, P., Maubert, E., Bardou, I., Nicole, O., Launay, S., Bezin, L., Vivien, D., Agin, V., 2011. Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 121-129.

Pollock, G. S., Vernon, E., Forbes, M. E., Yan, Q., Ma, Y. T., Hsieh, T., Robichon, R., Frost, D. O., Johnson JE., 2001. Effects of Early Visual Experience and Diurnal Rhythms on BDNF mRNA and Protein Levels in the Visual System, Hippocampus, and Cerebellum. *J. Neurosci.* 21, 3923-3931.

Prediger, R. D., Batista L. C., Takahashi, R. N., 2005. Caffeine reverses age related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol. Aging* 26, 957-964.

Quarta, D., Ferré, S., Solinas, M., You, Z. B., Hockemeyer, J., Popoli, P., Goldberg, S. R., Opposite modulatory roles for adenosine A1 and A2A receptors on glutamate and dopamine release in the shell of the nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. *J. Neurochem.* 88, 1151-1158.

Ritchie, K., Carrière, I., Portet, F., de Mendonca, A., Dartigues, J. F., Rouaud, O., Barberger Gateau, P., Ancelin, M. L., 2007. The neuro protective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology* 69, 536-545.

Rosenzweig, E. S., Barnes, C. A., 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in Neurobiology* 69, 143–179.

Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H., Cammarota, M., 2009. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325, 1017-1020.

Roussinov, K. S., Yonkov, D. I., 1976. Cholinergic mechanisms in the learning and memory facilitating effect of caffeine. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulgarica* 2, 61–68.

Sahin, B., Galdi, S., Hendrick, J., Greene, R. W., Snyder, G. L., Bibb, J. Á., 2007. Evaluation of neuronal phosphoproteins as effectors of caffeine and mediators of striatal adenosine A2A receptor signaling. *Brain Res.* 1129, 1–14.

Sebastiao, A. M., Ribeiro, J. A., 2009. Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* 193, 471-534.

Segovia, G., Del Arco, A., de Blas, M., Garrido, P., Mora, F., 2007. Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behav. Brain Res.* 187, 304–311.

Silhol, M., Bonnichon, V., Rage, F., Tapia-Arancibia, L., 2005. Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132, 613–624.

Silhol, M., Arancibia, S., Maurice, T., Tapia-Arancibia, L., 2007. Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats. *Neuroscience* 146, 962-973.

Silhol, M., Arancibia, S., Perrin, D., Maurice, T., Alliot, J., Tapia-Arancibia, L., 2008. Effect of aging on brain-derived neurotrophic factor, proBDNF, and their receptors in the hippocampus of Lou/C rats. *Rejuvenation Res.* 11, 1031-1040.

Stefanova, N.A., Fursova, A.Zh., Kolosova, N. G., 2010. Behavioral effects induced by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in Wistar and senescence-accelerated OXYS rats. *J. Alzheimers Dis.* 21, 479–491.

Stone, T. W., Ceruti, S., Abbracchio, M. P., 2009. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handb. Exp. Pharmacol.* 193, 535-87.

Strong, R., Grotta, J. C., Aronowski, J., 2000. Combination of low dose ethanol and caffeine protects brain from damage produced by focal ischemia in rats. *Neuropharmacology* 39, 515-522.

Tapia-Arancibia, L., Aliaga, E., Silhol, M., Arancibia, S., 2008. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Research Reviews* 59, 201-220.

Tsai, S. J., 2004. Down-regulation of the Trk-B signal pathway: the possible pathogenesis of major depression. *Med. Hypotheses* 62, 215-218.

Tyler, W. J., Alonso, M., Bramham, C. R., Pozzo-Miller, L. D., 2002. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn. Mem.* 9, 224–237.

Viola, H., Furman, M., Izquierdo, L. A., Alonso, M., Barros, D. M., de Souza, M. M., Izquierdo, I., Medina, J. H., 2000. Phosphorylated cAMP Response Element-Binding Protein as a Molecular Marker of Memory Processing in Rat Hippocampus: Effect of Novelty. *J. Neurosci.* 20, RC112.

Woo, N. H., Teng, H. K., Siao, C. J., Chiaruttini, C., Pang, P. T., Milner, T. A., Hempstead, B. L., Lu, B., 2005. Activation of p75<sup>NTR</sup> by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* 8, 1069-1077.

Yamada, K., Nabeshima, T., 2003. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J. Pharmacol. Sci.* 91, 267-270.

Yang, J., Siao, C. J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z. Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F. S., Lu, B., Hempstead, B. L., 2009. Neuronal release of proBDNF. *Nat. Neurosci.* 12, 113-115.



Legends to figures.

**Figure 1.** Chronic treatment with caffeine (1 mg/mL) during 30 days in the spontaneous locomotor activity of adult and middle-aged rats. Locomotor activity was assessed and recorded in the open field arena during 5 minutes. Data are presented as media + S.E.M. of the traveled distance in meters (n = 13-16).

<sup>#</sup> $P < 0.05$ , denotes a significant difference between middle-aged and adult rats (two-way ANOVA).

**Figure 2.** Performance in the inhibitory avoidance task for adult and middle-aged rats that received drinking water or caffeine during 30 days (1 mg/mL).

Results are presented as median and interquartile range of 13–16 rats.

\* $P < 0.05$ , differences between latencies of training and test session (Wilcoxon test).

<sup>#</sup> $P < 0.05$ , denotes a significant difference between middle-aged from adult rats.

<sup>#</sup> $P < 0.05$ , denotes a significant difference between test performed 24 hours after training of control middle-aged from adult rats and caffeine-treated middle-aged rats.

**Figure 3.** Immunoblotting analysis for BDNF, proBDNF, CREB and TrkB immuncontent in the whole hippocampus from adult and middle-aged rats that received drinking water or caffeine (1 mg/mL). All data are presented as means + S.E.M. of the density unit lines.

(A) – immunoblotting for BDNF (n = 9-10). \* $P < 0.05$ , difference between all groups (two-way ANOVA).

(B) – immunoblotting for proBDNF (n = 9-11). \* $P < 0.05$ , difference within each age group (two-way ANOVA).

(C) – immunoblotting for CREB (n = 6-8) - # $P < 0.05$  difference between adult and middle-aged control group. \* $P < 0.05$ , difference within and between each age group (two-way ANOVA).

(D) – immunoblotting for TrkB (n = 9-10) - # $P < 0.05$  difference between adult and middle-aged control group. \* $P < 0.05$ , difference within each age group (two-way ANOVA).

(E) – Representative bands of the immunoblotting with their respective molecular weights (kDa) for BDNF, proBDNF, CREB, TrkB and the standard proteins used for protein loading control (actin, tubulin and GAPDH). The bands were obtained from extracts of the whole hippocampus from adult and middle-aged rats that receive drinking water (water) or caffeine (1 mg/mL – caf).

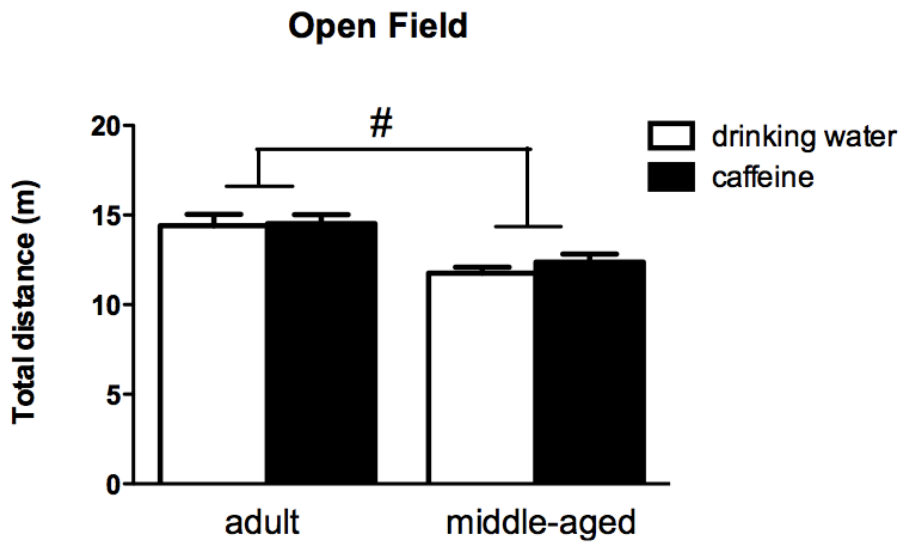


Figure 1

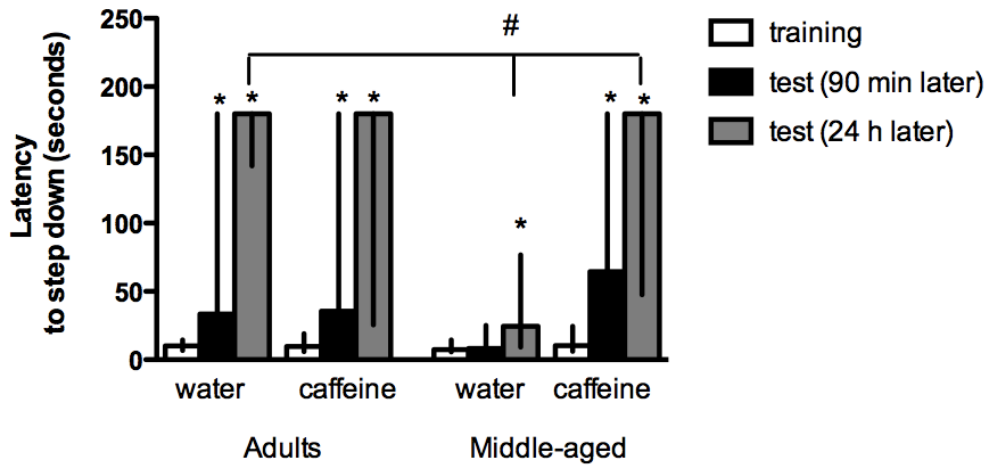


Figure 2

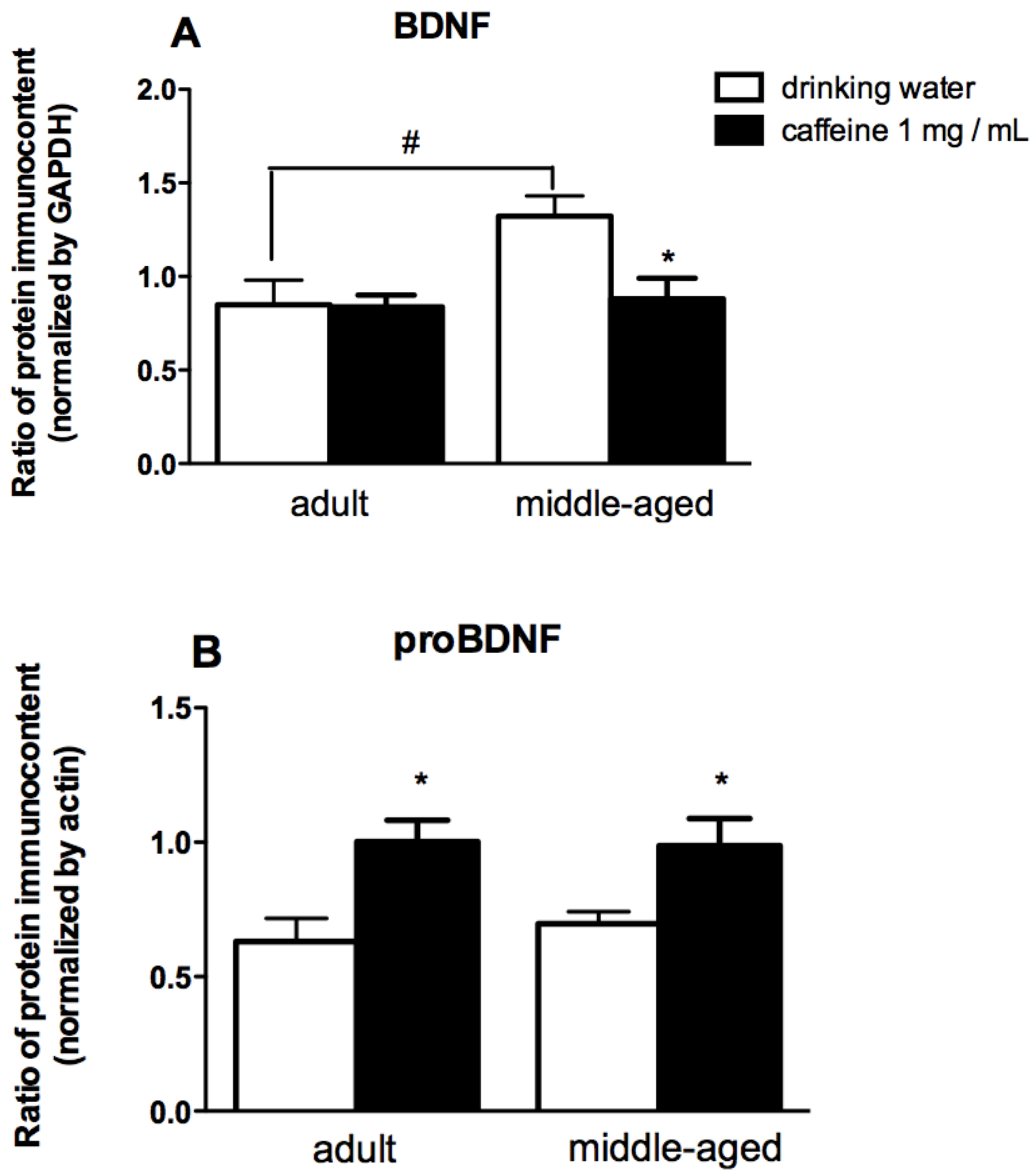


Figure 3. (A) and (B)

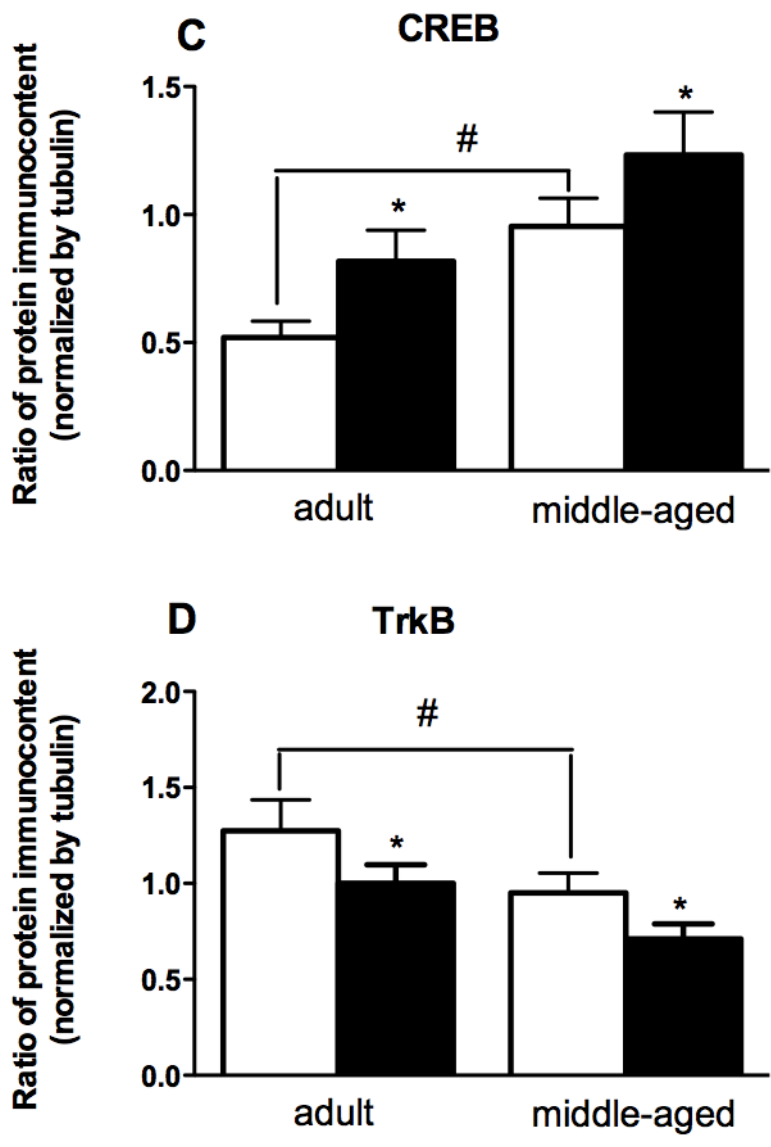
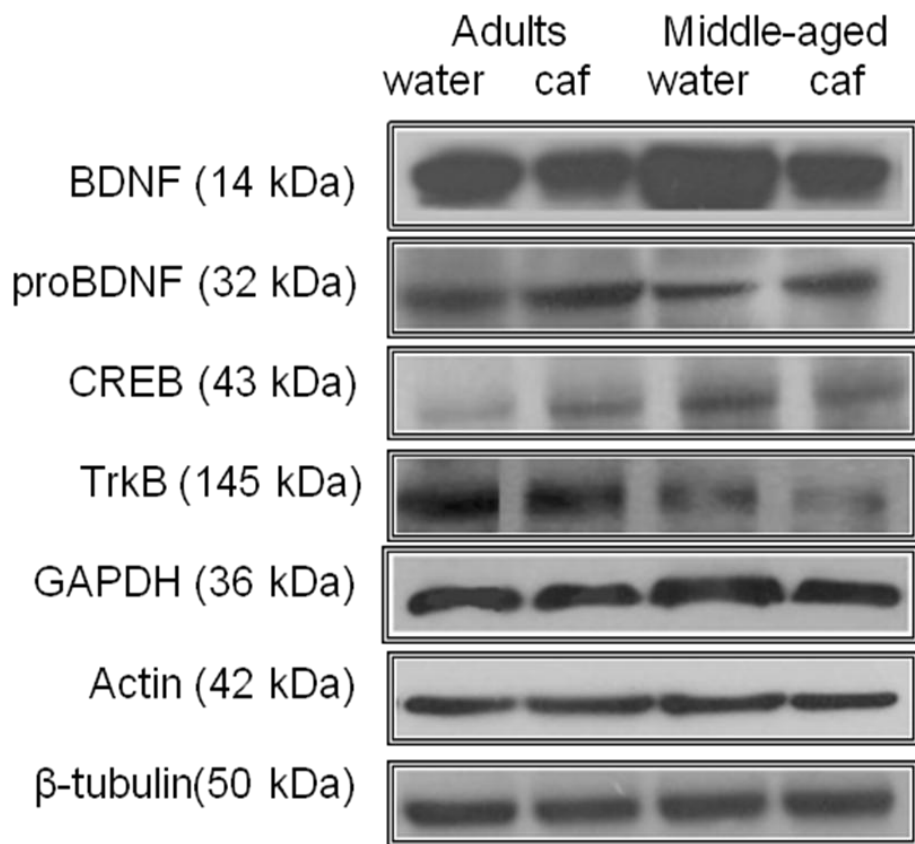


Figure 3. (C) and (D)



**Figure 3. (E)**

#### 4. DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou os efeitos de uma administração crônica de cafeína em animais adultos e de meia-idade na tarefa de esQUIVA inibitória. Além disso, o imunocnteúdo de pro-BDNF, BDNF, CREB e TrkB foram avaliados no hipocampo. Como demonstrado anteriormente, ratos de meia-idade apresentam uma diminuição na atividade locomotora em comparação com ratos adultos (Costa et al, 2012; Agafonova et al, 2001; Stefanova et al, 2010). O tratamento crônico com cafeína não alterou a diminuição da atividade locomotora relacionada à idade. Assim, qualquer efeito da cafeína sobre a memória não pôde ser relacionado a alterações na atividade locomotora.

A tarefa de esQUIVA inibitória é amplamente usada para avaliar diferentes tipos de memória após um estímulo aversivo. É uma forma de aprendizagem que envolve vários estímulos sensoriais incluindo a percepção espacial e visual, sensibilidade à dor, e componentes emocionais e de medo (Cammarota et al., 2007). Nesse estudo, a retenção da memória foi avaliada em dois momentos: primeiro aos 90 minutos após o treino para medir a memória de curta duração (STM) e novamente em 24 horas para medir a memória de longa duração (LTM). Animais adultos apresentaram desempenhos semelhantes, mas os animais de meia-idade apresentaram alterações nas duas memórias: comprometimento total da STM e comprometimento parcial da LTM. Diferenças na magnitude dos déficits de memória associado à idade têm sido relatados para algumas tarefas usadas para avaliar a aprendizagem e memória (Bergado et al., 2011). Sabe-se que os mecanismos envolvidos na formação e manutenção da STM são separados dos envolvidos no processo de consolidação da LTM. A STM pode estar comprometida sem afetar a LTM, e isso pode ser provocada por vários tratamentos agindo em receptores diferentes das vias de sinalização celular e em diferentes regiões do encéfalo. Além

disso, foi demonstrado que diversos tratamentos possuem efeitos opostos, dependendo do tipo de memória avaliada (Cammarota et al., 2007). O tratamento com cafeína mostrou efeitos diferenciados, dependendo do tipo de memória avaliado: foi capaz de restaurar a STM e aprimorar a LTM em ratos de meia-idade. Os resultados demonstraram que o declínio da memória relacionada à idade foi revertido pelo tratamento com cafeína.

Existem poucos estudos sobre os efeitos do tratamento crônico de cafeína em animais envelhecidos. Além disso, a maioria desses estudos sobre os efeitos do envelhecimento no comportamento animal foram realizados em animais velhos, e não durante a meia-idade (Moretti et al., 2011). No entanto, a prevenção do comprometimento de memória associado à idade está de acordo com dados anteriores do nosso grupo e de outros nos quais foram utilizadas diferentes tarefas para avaliar memória de reconhecimento, discriminação olfativa e memória social (Costa et al., 2008; Leite et al., 2011; Prediger et al., 2005). Dados do nosso grupo (Costa et al., 2008) demonstraram que o tratamento com cafeína durante 12 meses foi capaz de prevenir o comprometimento de memória em camundongos envelhecidos quando foi avaliada a memória de reconhecimento. Recentemente, Leite et al (2011) demonstrou que a cafeína foi capaz de reverter o comprometimento de memória em ratos envelhecidos após uma administração sub-crônica de 10 dias. Do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em que os efeitos benéficos do tratamento crônico de cafeína administrada por via oral foram descritos em ratos de meia-idade avaliados na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA.

Recentemente, Moretti et al (2011) investigaram os efeitos do envelhecimento na memória aversiva de ratos de meia-idade. Nesse estudo foi investigada apenas a



LTM na tarefa de esquiva inibitória, e foi encontrado um comprometimento total da memória nesses animais. No nosso estudo, encontramos um comprometimento total na STM e apenas um comprometimento parcial da LTM. Provavelmente devido a diferenças metodológicas aplicadas na tarefa da esquiva inibitória, os animais de meia-idade do nosso estudo demonstraram uma piora, mas não um comprometimento total na LTM. Na verdade, a intensidade da corrente elétrica aplicada foi maior do que no referido estudo e diferentemente de uma corrente elétrica fraca, a corrente elétrica forte persiste ao longo do tempo (Rossato et al., 2009).

O comprometimento da memória de curta e longa duração apresentada pelos animais de meia-idade foi prevenido pelo tratamento crônico com cafeína. Esses achados não são surpreendentes visto que estudos anteriores mostraram que a cafeína é capaz de promover uma melhora no desempenho de animais em algumas tarefas que avaliam a memória quando administrada de forma aguda (Angelucci et al, 1999; Botton et al, 2010; Costa et al, 2008b). Embora evidências de estudos anteriores tenham revelado as propriedades cognitivas benéficas de cafeína em uma variedade de tarefas comportamentais de aprendizagem e memória em roedores (Angelucci et al, 1999; Castellano, 1976; Costa et al, 2008b; Kopf et al., 1999; Roussinov e Yonkov, 1976), não encontramos diferenças entre os animais adultos tratados com cafeína em comparação ao grupo controle. Entretanto, na maioria dos casos, a administração de cafeína foi geralmente realizada de forma aguda (Costa et al, 2008b; Leite et al, 2011; Prediger et al, 2005) e deve se levar em conta a tolerância desenvolvida após a administração crônica que pode afetar os seus efeitos comportamentais (Karcz-Kubich et al., 2003). O tratamento prolongado de cafeína é capaz de dessensibilizar as respostas mediadas pelos receptores A<sub>1</sub> ao mesmo tempo em que aumenta a capacidade da cafeína

de bloquear os receptores A<sub>2A</sub> (Dall'Igna et al, 2007; Karcz-Kubicha et al, 2003; Quarta et al., 2004), e este mecanismo pode estar relacionado às diferenças entre os tratamentos agudo e crônico de cafeína.

A preocupação sobre treinar os animais duas vezes – primeiro 90 minutos após o treino, e novamente 24 horas depois – poderia alterar a LTM por um efeito de reforço foi descartado baseado em estudos anteriores que demonstraram que testes repetidos realizados durante as primeiras 4.5 horas após o treino não levam a extinção (Cammarota et al., 2007).

O BDNF é amplamente expresso no hipocampo maduro e no córtex cerebral (Pollock et em., 2001). Para avaliar esta neurotrofina, nós quantificamos o seu imunocontéudo no hipocampo, uma das regiões do encéfalo mais suscetível ao envelhecimento (Hattiangady et em., 2005). Neste estudo foi encontrado um aumento do imunocontéudo de BDNF associado à idade, o que não foi surpreendente, visto que este achado é consistente com dados anteriores de nosso laboratório, em que a análise do imunocontéudo de BDNF no hipocampo de camundongos envelhecidos com 18 meses de idade revelou um aumento robusto quando comparados com os adultos (Costa et al., 2008). No entanto, existem controvérsias sobre mudanças relacionadas à idade na expressão e no conteúdo de BDNF no hipocampo de ratos (Hattiangady et al., 2005). Estudos anteriores demonstraram que o conteúdo de BDNF varia em ratos envelhecidos dependendo de sua cepa (Tapia-Arancibia et em., 2008). Silhol et al (2005) demonstrou que ratos Sprague Dawley apresentaram uma diminuição do conteúdo BDNF no hipocampo e hipotálamo associado à idade, mas ao contrário, Katoh-Semba et al (1998) documentaram um aumento no conteúdo de BDNF no hipocampo de ratos envelhecidos da mesma cepa, ambos os estudos utilizando a mesma técnica de quantificação

(ELISA). Hattiangady et al (2005) demonstrou que em ratos Fischer 344 o conteúdo de BDNF diminuiu consideravelmente assim que esses animais alcançaram a meia-idade (12 meses) no giro denteado e nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, sem maiores alterações durante o envelhecimento. Além disso, em ratos Wistar machos, foi relatado um aumento relacionado à idade do conteúdo de BDNF no hipocampo (Silhol et al, 2007; Segovia et al, 2007). Considerados em conjunto, estes dados indicam que as alterações no conteúdo de BDNF durante o envelhecimento permanecem controversas.

Além disso, muitos estudos analisaram a expressão do BDNF, quantificando o RNAm e não a proteína (Lapchak et al, 1993; Kaisho et al, 1994; Hattiangady et al, 2005 ). É importante ressaltar que há uma controvérsia a respeito das mudanças relacionadas à idade no RNAm e no imunoc conteúdo de BDNF no hipocampo (Hattiangady et al, 2005; Kaisho et al, 1994; Katoh-Semba et al, 1998; Lapchak et al, 1993; Segovia et al, 2007; Silhol et al, 2005; 2007; Tapia-Arancibia et al, 2008). Da mesma forma, vários trabalhos têm mostrado que as mudanças nos níveis de mRNA não são necessariamente correlacionados com o imunoc conteúdo das proteínas (Alonso et al, 2002; Pollock et al, 2001; Tyler et al, 2002).

Adicionalmente, discrepâncias entre o RNAm e os níveis de proteína também são relatados após isquemias, convulsões ou lesão cerebral traumática (Binder et al, 2001; Pollock et al, 2001). Sabe-se que os processos de envelhecimento levam a alterações na microcirculação do encéfalo (Sutherland et al., 1996), o que aumenta a vulnerabilidade a isquemias. Alterações nos vasos sanguíneos privam pequenas áreas do encéfalo de sangue e oxigênio, e essas 'microisquemias' causam danos no tecido encefálico resultando em déficits cognitivos (Abbot, 2011). Talvez, o aumento do conteúdo de BDNF em ratos de meia-idade aqui apresentadas podem estar relacionadas

com microisquemias no encéfalo desses animais, o que poderia explicar o comprometimento de memória encontrado, apesar do aumento da neurotrofina.

Neste estudo, a administração de cafeína preveniu o aumento do imunoconteúdo de BDNF associado à idade, e este achado está de acordo com um estudo anterior do nosso grupo, em que a administração de cafeína durante a idade adulta até a velhice em camundongos impediu o aumento dessa neurotrofina (Costa et al., 2008a). Curiosamente, os níveis de BDNF foram normalizados para valores semelhantes aos quantificados em ratos adultos. Portanto, é possível que esta normalização reflita uma melhoria na sinalização operada pelo BDNF, uma vez que se sabe que alguns efeitos benéficos desencadeados pela cafeína estão relacionados com o bloqueio preferencial dos receptores de adenosina  $A_{2A}$ , no qual a sinalização do BDNF também parece atuar (Costa et al., 2008a). No entanto, apesar de a cafeína ser capaz de modificar algumas proteínas envolvidas na cascata de sinalização do BDNF, ainda não foi determinado se a cafeína pode afetar algum sinal nas vias de sinalização operadas pelo BDNF (Costa et al, 2008a; Sahin et al, 2007). Além disso, foi demonstrado que o tratamento crônico de cafeína aumenta o número de receptores de adenosina no encéfalo (Rudolphi et al., 1989), e este *upregulation* dos receptores, em combinação com aumento na concentração de adenosina no encéfalo produzida em resposta à quebra de ATP durante a isquemia, poderia aumentar a estimulação da transdução das vias inibitória de adenosina, resultando em neuroproteção (Strong et al, 2000; Miller e Hsu, 1992).

Nesse estudo, não foi observado modificações relacionadas à idade no imunoconteúdo de proBDNF. De acordo com um estudo recente, o proBDNF no hipocampo não é modificado com a idade (Obiang et al., 2011), mas a cafeína foi capaz de promover o seu aumento em adultos, bem como em animais de meia-idade. A pró-

região das neurotrofinas pode desempenhar um papel crítico no direcionamento sináptico e na liberação atividade-dependente nas sinapses (Lu et al., 2005). O proBDNF endógeno é rapidamente convertido em BDNF, que promove a potenciação sináptica, sugerindo uma regulação bidirecional da plasticidade sináptica pelo proBDNF e pelo BDNF maduro (Woo et al., 2005). Visto que o receptor p75 pode ser dinamicamente regulado em danos no sistema nervoso central, uma função plausível das proneurotrofinas é também eliminar as células danificadas que expressam p75 (Lu et al., 2005). O equilíbrio entre sobrevivência e morte celular pode depender da proporção de neurotrofinas maduras e proneurotrofinas. A regulação da expressão ou ativação de proteases específicas em condições fisiológicas ou patológicas específicas (stress, envelhecimento, neurodegeneração, inflamação ou lesão) pode, portanto, ser extremamente importante na determinação das respostas celulares pró ou anti-apoptóticas (Tapia-Arancibia et al., 2008). Neste contexto, embora o aumento do proBDNF causado pela cafeína em ratos adultos não tenha sido relacionado com alterações comportamentais, em animais de meia-idade esse aumento poderia ser um aumento precoce para minimizar qualquer dano adicional associado à idade no hipocampo. Da mesma forma, o aumento de BDNF associado à idade também pode ser um sinal precoce para minimizar muitas mudanças morfológicas relacionadas à idade no hipocampo, tais como a perda sináptica seguida de morte neuronal, a redução da densidade dos espinhos dendríticos, diminuição da neurogênese no giro denteado e redução na persistência da potenciação de longa duração (LTP) nas sinapses do hipocampo, o que provavelmente contribui o comprometimento de aprendizagem e memória relacionadas à idade (Barnes and McNaughton, 1985; Erickson e Barnes, 2003; Halbach, 2010; Hattiangady et al, 2005; Jolita et al., 2009). A ausência de

correlação entre as alterações do proBDNF e do BDNF pode também refletir um aumento do *turnover* (processo constante de síntese e degradação de proteínas) da proteína BDNF ou pode refletir a ausência de tradução do mRNA recém-sintetizado, sugerindo que o gene do BDNF é regulada tanto ao nível da tradução como da transcrição. Alternativamente, mudanças na liberação de BDNF podem explicar essa discrepância entre BDNF e proBDNF (Alonso et al, 2002; Pollock et al, 2001).

Considerando que o BDNF pode desempenhar um papel no declínio cognitivo relacionado à idade, é importante entender como o seu receptor de alta afinidade, TrkB, muda com a idade e com o comprometimento de memória associado à idade (Croll et al., 1998). Neste estudo foi encontrado uma diminuição significativa associada à idade do receptor TrkB no hipocampo. Este achado é consistente com estudos anteriores, nos quais foi encontrada uma diminuição tanto do conteúdo de proteína quanto do RNAm de TrkB em ratos envelhecidos (Croll et al, 1998; Silhol et al, 2005; Silhol et al, 2008). No entanto, deve-se considerar a existência de diferenças entre as isoformas completas e truncadas de TrkB (*TrkB full-length* e *TrkB truncated*) na mesma amostra, e aqui nós analisamos o conteúdo total desses receptores TrkB.

É provável que esta alteração dos receptores TrkB apresentadas nesse estudo é que esteja relacionada ao comprometimento de memória associado à idade apresentado por ratos de meia-idade (Croll et al., 1998). De fato, após a ligação do ligante, os receptores TrkB são geralmente internalizados e, em seguida, rapidamente degradados (Silhol et al., 2008). A diminuição do imunoc conteúdo desse receptor poderia provavelmente ser associada com modificações bioquímicas que ocorrem durante o envelhecimento, ou seja, glicação e carbonilação, que tecnicamente impedem o seu

reconhecimento pelo anticorpo e, possivelmente, pelo ligante (Silhol et al, 2008; Tapiar-Arancibia et al., 2008).

Além disso, deve se levar em consideração a capacidade de *downregulation* do BDNF sobre os receptores de TrkB (Binder et al, 2001;. Chen e Weber, 2004; Knusel et al, 1997). Esta capacidade pode resultar na disfunção do receptor TrkB por si só ou em um dos componentes da sua via de sinalização (Tsai, 2004), e assim, seria razoável especular que o aumento associado à idade dos níveis de BDNF levaria a *downregulation* dos receptores TrkB e redução da sua responsividade, um efeito normalizado pelo tratamento com cafeína que promoveu um impacto positivo na aprendizagem e memória.

Apesar da diminuição do imunocontéudo de TrkB, a cafeína ainda foi capaz de melhorar o desempenho da memória nos ratos de meia-idade. Este efeito pode ser explicado pelo envolvimento dos receptores TrkB/A<sub>2A</sub>. Estudos anteriores demonstraram que os efeitos neuroprotetores da cafeína parecem estar relacionados ao bloqueio preferencial dos receptores A<sub>2A</sub> (Dall'Igna et al, 2003; Higgins et al, 2007; Huang et al, 2005; Silva et al., 2007) e que a função dos receptores TrkB é modulada pela ativação de receptores de adenosina A<sub>2A</sub> (Lee e Chao, 2001; Diógenes et al, 2004; Assaife-Lopes et al, 2010). Além disso, foi demonstrado que os receptores A<sub>2A</sub> são capazes de transativar os receptores TrkB na ausência de BDNF (Lee e Chao 2001). No entanto, assim como para o BDNF, ainda não foi determinado se a cafeína pode afetar algum sinal nas vias de sinalização operadas pelo TrkB.

Nesse estudo, assim como o BDNF, foi encontrado um aumento de CREB associado à idade e um aumento do seu imunocontéudo com o tratamento de cafeína.

Alterações da atividade de CREB foram demonstradas em ratos envelhecidos (Asanuma et al., 1996). O CREB é um fator de transcrição estritamente envolvido na formação da LTM, sendo ativado no hipocampo durante o processo de aprendizagem (Alonso 2002; Finkbeiner 1997; Viola et al, 2000; Yamada e Nabeshima, 2003). CREB é considerado o principal mediador da resposta neuronal do BDNF (Finkbeiner et al., 1997) e seu aumento observado pelo tratamento com a cafeína pode contribuir para os efeitos positivos sobre a memória encontrado neste estudo.

Apesar do tratamento com cafeína aumentar os níveis de CREB e proBDNF em ratos adultos, não foram encontradas diferenças nas tarefas comportamentais. Talvez realizando um tempo de tratamento maior, ou mesmo em uma idade mais avançada, estes efeitos poderiam melhorar de alguma forma o desempenho desses animais em tarefas de memória.



## 5. CONCLUSÃO

A ocorrência de demência está crescendo substancialmente em todo o mundo. Os processos patológicos que conduzem à demência iniciam décadas antes da manifestação clínica da doença (Kivipelto et al, 2006;. Eskelinen et al, 2009;. Nooyens et al, 2011.). Assim, grandes esforços para a prevenção de demência são necessários.

A partir desse estudo, foi possível mais uma vez observar os efeitos positivos da cafeína sobre declínio cognitivo associado à idade. Entretanto, diferentemente dos estudos anteriores a intervenção foi feita quando esse declínio começou a se estabelecer e a cafeína foi capaz de revertê-lo. Esses resultados reforçam a possibilidade de que intervenções dietéticas podem melhorar a qualidade de vida das pessoas em idade avançada. Esses achados corroboram com os estudos anteriores sobre o potencial da cafeína em reverter o declínio cognitivo associado à idade com a participação das vias de sinalização mediadas pelo BDNF. Dessa maneira, outros alvos moleculares da cafeína além dos receptores de adenosina vem sendo conhecidos e ajudam a explicar os seus efeitos benéficos em doses moderadas.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Abbot, A. A problem for our age. *Nature*, 475: S2-4, 2011.
2. Agafonova, I. G., Kolosova, N. G., Mishchenko, N. P., Chaikina, E. L., Stonik, V. A. Effect of histochrome on brain vessels and research and exploratory activity of senescence accelerated OXYS rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 143, 467–471, 2007.
3. Albert, M.S. Memory decline: the boundary between aging and age-related disease. *Annals of Neurology*, 51 (3): 282-284, 2002.
4. Alhaider, I.A., Aleisa, A.M., Tran, T.T., Alkadhi, K.A. Sleep deprivation prevents stimulation-induced increases of levels of P-CREB and BDNF: protection by caffeine. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46: 742–751, 2011.
5. Alonso, M., Vianna, M. R., Depino, A. M., Mello e Souza T., Pereira P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., Medina, J. H. BDNF-Triggered Events in the Rat Hippocampus Are Required for Both Short- and Long-Term Memory Formation. *Hippocampus*, 12, 551-560, 2002.
6. Angelucci, M. E., Vital, M. A., Cesário, C., Zadusky, C. R., Rosalen, P. L., Da Cunha C. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. *Euro. J. Pharmacol.* 373, 135–140, 1999.
7. Angelucci, M.E., 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, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 1201–1208, 2002.

8. Arendash, G.W., Schleif, W., Rezai-Zadeh, K., Jackson, E.K., Zacharia, C., Cracchiolo, J.R., Shippy, D., and Tan, J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain  $\beta$ -amyloid production. *Neurosci.* 142: 941–952, 2006.
9. Arendash, G. W., Mori, T., Cao, C., Mamcarz, M., Runfeldt, M., Dickson, A., Rezai-Zadeh, K., Tan, J., Citron, B. A., Lin, X., Echeverria, V., Potter, H. Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. *J Alzheimers Dis* 17, 661-680. 2009.
10. Asanuma, M., Nishibayashi, S., Iwata, E., Kondo, Y., Nakanishi, T., Gomez, M., Ogawa, N. Alterations of cAMP response element-binding activity in the aged rat brain in response to administration, of rolipram, a cAMP-specific phosphodiesterase inhibitor. *Mol. Brain. Res.* 41, 210–215, 1996.
11. Barboza, IG. Estudo da concentração plasmática de fatores neurotróficos (BDNF, NGF e GDNF) em pacientes com transtorno bipolar do humor. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
12. Barnes, C. A., McNaughton, B. L. An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to longterm enhancement of hippocampal synapses. *Behav. Neurosci.* 99, 1040–1048, 1985.
13. Barnes, P., Thomas, K. L. Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. *PLoS. ONE.* 3, e3248, 2008.

14. Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53, 261–277, 2007.
15. Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., Izquierdo, I., Medina, J. H. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105, 2711-2716, 2008.
16. Bergado, J. A., Almaguer, W., Rojas, Y., Capdevila, V., Frey, J. U. Spatial and emotional memory in aged rats: a behavioral-statistical analysis. *Neuroscience.* 172, 256-269, 2011.
17. Binder, D. K., Croll, S.D, Gall, C. M., Scharfman, H. E. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends. Neurosci.* 24, 47-53, 2001.
18. Botton, P.H., Costa, M.S., Ardais, A.P., Mioranza, S., Souza, D.O., da Rocha, J.B., Porciúncula, L.O. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behav Brain Res.* 25;214(2):254-9, 2010.
19. Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Medina, J. H., Izquierdo, I. Studies of short-term avoidance memory. In: Bermúdez-Rattoni F, editor. *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging.* Boca Raton (FL): CRC Press; Chapter 10. *Frontiers in neuroscience*, 2007.

20. Castellano, C. Effects of caffeine on discrimination learning, consolidation, and learned behavior in mice. *Psychopharmacology (Berlin)*. 48, 255–260, 1976.
21. Cerpa, W., Dinamarca, M.C., Inestrosa, N.C. Structure-function implications in Alzheimer's disease: effect of Abeta oligomers at central synapses. *Curr Alzheimer Res*. 5(3):233-43, 2008.
22. Chaimowicz, F. Os idosos brasileiros no século XXI: demografia, saúde e sociedade. Belo Horizonte: Postgraduate, 1998.
23. Chao, M.V. Neurotrophins and their receptors: a converge point for many signaling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 4 (4),199-309, 2003.
24. Chen, H., Weber, A. J. Brain-derived neurotrophic factor reduces TrkB protein and mRNA in the normal retina and following optic nerve crush in adult rats. *Brain. Res*. 1011, 99-106, 2004.
25. Chen, J.F., Yu, L., Shen, H.Y., He, J.C., Wang, X., Zheng R. What knock-out animals tell us about the effects of caffeine. *J Alzheimers Dis*. 20(1):S17-24, 2010.
26. Costa, M.S., Botton, P.H., Mioranza, S., Souza, D.O., Porciúncula, L.O. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tirosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience*, 153:1071–8, 2008a.
27. Costa, M. S., Botton, P. H., Mioranza, S., Ardais, A. P., Moreira, J. D., Souza, D. O., Porciúncula, L. O. Caffeine improves adult mice performance

in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunoccontent in the hippocampus. *Neurochem. Int.* 53, 89–94, 2008b.

28. Croll, S. D., Ip, N. Y., Lindsay, R. M., Wiegand, S. J. Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain. Res.* 812, 200–208, 1998.
29. Crook, T., Bartus, R. T., Ferris, S. H., Whitehouse, P., Cohen, G. D., Gershon, S. Age-associated memory impairment: proposed diagnostic criteria and measures of clinical change. Report of a National Institute of Mental Health Work Group. *Dev. Neuropsychol.* 2, 261–276, 1986.
30. Cunha, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: Different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38: 107-125, 2001.
31. Cunha, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signalling* 1, 111–134, 2005.
32. Cunha, R.A., Agostinho, P.M. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J Alzheimers Dis.* 20(1):S95-116, 2010.
33. Dall'igna, O. P., Porciuncula, L. O., Souza, D. O., Cunha, R. A., Lara, D. R. Neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor blockade of beta amyloid neurotoxicity. *Br. J. Pharma.* 138,1207-1209, 2003.

34. Dall'Igna, O. P., Fett, P., Gomes, M. W., Souza, D. O., Cunha, R. A., Lara, D. R. Caffeine and adenosine A2A receptor antagonists prevent beta amyloid (25 35) induced cognitive deficits in mice. *Exp. Neurol.* 203,241-245, 2007.
35. Diogenes, M. J., Fernandes, C. C., Sebastiao, A. M., Ribeiro, J. A. Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 24, 2905-2913, 2004.
36. Dudley, M., Hitchcock, J., Sorensen, S., Chaney, S., Zwolshen, J., and Lentz, N. Adenosine A1 receptor antagonists as cognition enhancers, *Drug Dev. Res.* 31: 31–266, 1994.
37. Erickson, C. A., Barnes, C. A. The neurobiology of memory changes in normal aging. *Experimental Gerontology.* 38, 61–69, 2003.
38. Eskelinen, M. H., Ngandu, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., Kivipelto, M. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE Study. *Journal of Alzheimer's Disease.* 16, 85–91, 2009.
39. Finkbeiner, S., Tavazoie, S., Maloratsky, A., Jacobs, K., Harris, K., Greenberg, M. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron.* 19,1031–1047, 1997.
40. 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.* 51, 83-133, 1999.

41. Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.-N., and Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53: 527–552, 2001.
42. Fredholm, B. B., Cunha, R., Svenningsson, P. Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 413-426, 2003.
43. Fredholm, B.B., Chen, J.F., Cunha, R.A., Svenningsson, P., and Vaugeois, J.M. Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol.* 63: 191–270, 2005.
44. Fredholm, B. B. Methylxanthines. *Handbook of Experimental Pharmacology.* 200, 268-293, 2011.
45. Gallagher, M., Rapp, P.R. The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annu Rev Psychol.* 48:339-70, 1997.
46. Glisky, E. L. Changes in Cognitive Function in Human Aging. In: Riddle DR, editor. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms.* Boca Raton (FL): CRC Press; *Frontiers in Neuroscience: Chapter 1*, 2007.
47. Greenberg, M. E., Xu, B., Lu, B., Hempstead, B. L. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J. Neurosci.* 29, 12764-12767, 2009.
48. Hashimoto, K. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: An historical overview and future directions. *Psych Clin Neurosci,* 64: 341–357, 2010.



49. Hattiangady, B., Rao, M. S., Shetty, G. A., Shetty, A. K. Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. *Exp. Neurol.* 195, 353-371, 2005.
50. Hauber, W., and Bareiss, A. Facilitative effects of an adenosine A1:A2 receptor blockade on spatial memory performance of rats: selective enhancement of reference memory retention during light period, *Behav. Brain Res.* 118: 43–52, 2001.
51. Higgins, G.A., Grzelak, M.E., Pond, A.J., Cohen-Williams, M.E., Hodgson, R.A., Varty, G.B. The effect of caffeine to increase reaction time in the rat during a test of attention is mediated through antagonism of adenosine A(2A) receptors. *Behav Brain Res*, 185:32–42, 2007.
52. Homayoun, H., Khavandgar, S., and Zarrindast, M.R. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on pentylentetrazoleinduced amnesia, *Eur. J. Pharmacol.* 430: 289–294, 2011.
53. Huang, Z.L., Qu, W.M., Eguchi, N., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Fredholm, B.B., Urade, Y., Hayaishi, O. Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci*, 8: 858–859, 2005.

54. Izquierdo, I., Medina, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68:285–316, 1997.
55. Jarvis, M. J. Does caffeine intake enhance absolute levels of cognitive performance? *Psychopharmacology*.110, 45-52, 1993.
56. Johnson-Kozlow, M., Kritz-Silverstein, D., Barrett-Connor, E., Morton, D. Coffee consumption and cognitive function among older adults. *Am. J. Epidemiol.* 156, 842-850, 2002.
57. Jorm, A.F. The epidemiology of Alzheimer's disease and related disorders. London: Shapman and Hall, 1990.
58. Kaisho, Y., Miyamoto, M., Shiho, O., Onoue, H., Kitamura, Y., Nomura, S. Expression of neurotrophin genes in the brain of senescence-accelerated mouse (SAM) during postnatal development. *Brain. Res.* 647, 139–144, 1994.
59. Kalache, A., Veras, R.P., Ramos, L.R. O envelhecimento da população mundial: um desafio novo. *Rev Saúde Públ.* 21: 200-210, 1987.
60. Kalache, A. Prefácio, In: Chaimowicz F. Os idosos brasileiros no século XXI: demografia, saúde e sociedade. Belo Horizonte: Postgraduate, 1998.
61. Karcz-Kubicha, M., Antoniou, K., Terasmaa, A., Quarta, D., Solinas, M., Justinova, Z., Pezzola, A., Reggio, R., Müller, C. E., Fuxe, K., Goldberg, S. R., Popoli, P., Ferré, S. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in

the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. *Neuropsychopharmacology*. 28, 1281-1291, 2003.

62. Katoh-Semba, R., Semba, R., Takeuchi, I. K., Kato, K. Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neurosci. Res.* 31, 227-234, 1998.
63. Kemper, T. The relationship of cerebral cortical changes to nuclei in the brainstem. *Neurobiol Aging* 14:659–660, 1993.
64. Kivipelto, M., Ngandu, T., Laatikainen, T., Winblad, B., Soininen, H., Tuomilehto, J. Risk score for the prediction of dementia risk in 20 years among middle aged people: a longitudinal, population-based study. *Lancet. Neurol.* 5, 735-741, 2006.
65. Klein, R., Jing, S. Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Barbacid, M. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65, 189-197, 1990.
66. Knusel, B., Gao, H., Okazaki, T., Yoshida, T., Mori, N., Hefti, F., Kaplan, D. R. Ligand-induced down-regulation of Trk messenger RNA, protein and tyrosine phosphorylation in rat cortical neurons. *Neuroscience* 78, 851-862, 1997.
67. Kopf, S. R., Melani, A., Pedata, F., Pepeu, G. Adenosine and memory storage: effect of A(1) and A(2) receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berlin)* 146, 214–219, 1999.

68. Kornack, D., Rakic, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5768–5773, 1999.
69. Lamballe, F., Klein, R., Barbacid, M. TrkC, a new member of the Trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967–979, 1991.
70. Lapchak, P. A., Araujo, D. M., Beck, K. D., Finch, C. E., Johnson, S. A., Hefti, F. BDNF and trkB mRNA expression in the hippocampal formation of aging rats. *Neurobiol. Aging* 14, 121–126, 1993.
71. Lee, F. S, Chao, M.V. Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 3555–3560, 2001.
72. Leite, M. R., Wilhelm, E.A., Jesse, C. R., Brandão, R., Nogueira, C. W. Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. *Exp. Gerontol.* 46, 309-315, 2011.
73. Lessmann, V., Gottmann, K., Malcangio, M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341-374, 2003.
74. Linnarsson, S., Björklund, A., Ernfors, P. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci.* 9(12):2581-7, 1997.
75. Lu, B., Chow, A. Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. *J. Neurosci. Res.* 58: 76-87, 1999.

76. Lu, B., Pang, P. T., Woo, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev. Neurosci.* 6, 603-14, 2005.
77. Maia, L., de Mendonca, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur. J. Neurol.* 9, 377-382, 2002.
78. Miller, L. P., Hsu, C. Therapeutic potential for adenosine receptor activation in ischemic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 9, S563–577, 1992.
79. Morrison, J. H., Hof, R. P. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278:412–419, 1997.
80. Moretti, M., de Souza, A.G., de Chaves, G., de Andrade, V. M., Romao, P. R., Gavioli, E. C., Boeck, C. R. Emotional behavior in middle-aged rats: Implications for geriatric psychopathologies. *Physiol. Behav.* 102, 115-120, 2011.
81. Nehlig, A., Daval, J.L., and Debry, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects, *Brain Res. Rev.* 17: 139–179, 1992.
82. Neilsen, K., Peters, A. The effects on the frequency of nerve fibers in rhesus monkey striate cortex. *Neurobiol Aging* 21: 621–628, 2000.
83. Nitrini, R. Epidemiologia da Doença de Alzheimer no Brasil. *Rev Psiq Clín,* 26: 262-267, 1999.
84. Nooyens, A. C. J., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Boxtel, M. P. J., van Gelder, B. M., Verhagen, H., Verschuren, W. M. M. Fruit and vegetable

- intake and cognitive decline in middle-aged men and women: the Doetinchem Cohort Study. *British Journal of Nutrition* 106, 752-761, 2011.
85. Normile, H.J., and Barraco, R.A. N6-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A1 receptors, *Brain Res.* 27: 101–104, 1991.
86. Obiang, P., Maubert, E., Bardou, I., Nicole, O., Launay, S., Bezin, L., Vivien, D., Agin, V. Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 121-129, 2011.
87. Ohno, M., and Watanabe, S. Working memory failure by stimulation of hippocampal adenosine A1 receptors in rats, *NeuroReport* 7: 3013–3016, 1996.
88. Peng, S., Garzon, D.J., Marchese, M., Klein, W., Ginsberg, S.D., Francis, B.M., Mount, H.T.J., Mufson, E.J., Salehi, A., Fahnstock, M. Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience.* 29:9321–9329, 2009.
89. Pereira, G.S., Mello & Souza, T., Vinade, E.R.C., Choi, H., Rodrigues, C., Battastini A.M.O., Izquierdo, I., Sarkis, J.J.F., and Bonan, C.D. Blockade of adenosine A1 receptors in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 437: 151–154, 2002.

90. Pollock, G. S., Vernon, E., Forbes, M. E., Yan, Q., Ma, Y. T., Hsieh, T., Robichon, R., Frost, D. O., Johnson JE. Effects of Early Visual Experience and Diurnal Rhythms on BDNF mRNA and Protein Levels in the Visual System, Hippocampus, and Cerebellum. *J. Neurosci.* 21, 3923-3931, 2001.
91. Poo, M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, 2(4):24-32, 2001.
92. Popp, J., Arlt, S. Pharmacological treatment of dementia and mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease. *Curr Opin Psychiatry.* 24(6):556-61, 2011.
93. Prediger, R.D., Takahashi, R.N. Modulation of short term social memory in rats by adenosine A1 and A(2A) receptors. *Neurosci Lett*, 376:160-165, 2005.
94. Prediger, R. D., Batista L. C., Takahashi, R. N. Caffeine reverses age related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol. Aging* 26, 957-964, 2005.
95. Quarta, D., Ferré, S., Solinas, M., You, Z. B., Hockemeyer, J., Popoli, P., Goldberg, S. R. Opposite modulatory roles for adenosine A1 and A2A receptors on glutamate and dopamine release in the shell of the nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. *J. Neurochem.* 88, 1151-1158, 2004.

96. Ritchie, K., Carrière, I., Portet, F., de Mendonca, A., Dartigues, J. F., Rouaud, O., Barberger Gateau, P., Ancelin, M. L. The neuro protective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology* 69, 536-545, 2007.
97. Rosenzweig, E. S., Barnes, C. A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in Neurobiology* 69, 143–179, 2003.
98. Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H., Cammarota, M. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325, 1017-1020, 2009.
99. Roussinov, K. S., Yonkov, D. I. Cholinergic mechanisms in the learning and memory facilitating effect of caffeine. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulgarica* 2, 61–68, 1976.
100. Rudolphi, K.A., Keil, M., Fastbom, J., Fredholm, B.B. Ischaemic damage in gerbil hippocampus is reduced following upregulation of adenosine (A1) receptors by caffeine treatment. *Neuroscience Letters*, 103: 275–280, 1989.
101. Sahin, B., Galdi, S., Hendrick, J., Greene, R. W., Snyder, G. L., Bibb, J. A. Evaluation of neuronal phosphoproteins as effectors of caffeine and mediators of striatal adenosine A2A receptor signaling. *Brain Res.* 1129, 1–14, 2007.
102. Salawu, F. K., Umar, J. T., Olokoba, A. B. Alzheimer's disease: A review of recent developments. *Ann Afr Med* 10:73-9, 2011.



103. Santos, A.J. Influência dos receptores A<sub>2A</sub> da adenosina no efeito neuroprotector do BDNF na morte neuronal induzida. 2009. 91f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa. 2009.
104. Sebastiao, A. M., Ribeiro, J. A. Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* 193, 471-534, 2009.
105. Segovia, G., Del Arco, A., de Blas, M., Garrido, P., Mora, F. Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behav. Brain Res.* 187, 304–311, 2007.
106. Selkoe, D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487-498, 1991.
107. Silhol, M., Bonnichon, V., Rage, F., Tapia-Arancibia, L. Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132, 613–624, 2005.
108. Silhol, M., Arancibia, S., Maurice, T., Tapia-Arancibia, L. Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats. *Neuroscience* 146, 962-973, 2007.
109. Silhol, M., Arancibia, S., Perrin, D., Maurice, T., Alliot, J., Tapia-Arancibia, L. Effect of aging on brain-derived neurotrophic factor,

- proBDNF, and their receptors in the hippocampus of Lou/C rats. *Rejuvenation Res.* 11, 1031-1040, 2008.
110. Silva, C.G., Porciuncula, L.O., Canas, P.M., Oliveira, C.R., Cunha, R.A. Blockade of adenosine A2A receptors prevents staurosporine-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. *Neurobiol Dis*, 27:182–189, 2007.
111. Smith, T., Adams, M., Gallagher, M., Morrison, J., Rapp, P. Circuitspecific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J Neurosci* 20:6587–6593, 2000.
112. Smith, D.A. Treatment of Alzheimer’s disease in the long-term-care setting. *Am J Health-Syst Pharm.* 66: 899-907, 2009.
113. Solinas, M., Ferré, S., Antoniou, K., Quarta, D., Justinova, Z., Hockemeyer, J., Pappas, L.A., Segal, P.N., Wertheim, C., Muller, C.E., Goldberg, S.R. Involvement of adenosine A1 receptors in the discriminative-stimulus effects of caffeine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 179: 576–586, 2005.
114. Soppet, D., Escandon, E., Maragos, J., Middlemas, D. S., Reid, S. W., Blair, J., Burton, L. E., Stanton, B. R., Kaplan, D. R., Hunter, T., Nikolics, K., Parada, L. F. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the TrkB tyrosine kinase receptor. *Cell* 65, 895–903, 1991.

115. Squire L, Zola S. Amnesia, memory and brain systems. *Philos Trans R Soc Lond* 1997;29:1663–1673, 1997.
116. Stefanova, N.A., Fursova, A.Zh., Kolosova, N. G. Behavioral effects induced by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in Wistar and senescence-accelerated OXYS rats. *J. Alzheimers Dis.* 21, 479–491, 2010.
117. Stone, T. W., Ceruti, S., Abbracchio, M. P. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handb. Exp. Pharmacol.* 193, 535-87, 2009.
118. Strong, R., Grotta, J. C., Aronowski, J. Combination of low dose ethanol and caffeine protects brain from damage produced by focal ischemia in rats. *Neuropharmacology* 39, 515-522, 2000.
119. Sutherland, G.R., Dix, G.A., Auer, R.N. Effect of Age in Rodent Models of Focal and Forebrain Ischemia. *Stroke*, 27(9):1663-7, 1996.
120. Suzuki, F., Shimada, J., Shiozaki, S., Ichikawa, S., Ishii, A., Nakamura, J., Nonaka, H., Kobayashi, H., and Fuse, E. Adenosine A1 antagonists. 3. Structure-activity relationships on amelioration against scopolamine- or N6-((R)-phenylisopropyl) adenosine-induced cognitive disturbance. *J. Med. Chem.* 36: 2508–251, 1993.
121. Tapia-Arancibia, L., Aliaga, E., Silhol, M., Arancibia, S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Research Reviews* 59, 201-220, 2008.

122. Tsai, S. J. Down-regulation of the Trk-B signal pathway: the possible pathogenesis of major depression. *Med. Hypotheses* 62, 215-218, 2004.
123. Tyler, W. J., Alonso, M., Bramham, C. R., Pozzo-Miller, L. D. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn. Mem.* 9, 224–237, 2002.
124. Tyler, W.J., Pozzo-Miller, L. Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J. Physiol.* 553: 497-509, 2003.
125. Viola, H., Furman, M., Izquierdo, L. A., Alonso, M., Barros, D. M., de Souza, M. M., Izquierdo, I., Medina, J. H. Phosphorylated cAMP Response Element-Binding Protein as a Molecular Marker of Memory Processing in Rat Hippocampus: Effect of Novelty. *J. Neurosci.* 20, RC112, 2000.
126. West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., Troncoso, J. C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal aging and Alzheimer's disease. *Lancet* 344: 769–72, 1994.
127. Woo, N. H., Teng, H. K., Siao, C. J., Chiaruttini, C., Pang, P. T., Milner, T. A., Hempstead, B. L., Lu, B. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* 8, 1069-1077, 2005.
128. Yamada, K., Nabeshima, T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J. Pharmacol. Sci.* 91, 267-270, 2003.

129. Yang, J., Siao, C. J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z. Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F. S., Lu, B., Hempstead, B. L. Neuronal release of proBDNF. *Nat. Neurosci.* 12, 113-115, 2009.
130. Zarrindast, M.R., and Shafaghi, B. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on acquisition of passive avoidance learning, *Eur. J. Pharmacol.* 256: 233–239, 1994.

## 7. ANEXO – TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

A tarefa de reconhecimento de objetos, originalmente propostos por Ennaceur e Delacour (1988) e recentemente revisado por Besheer e Bevins (2006), é uma ferramenta experimental de bastante utilidade. O protocolo fundamental deste modelo é bastante simples e utiliza basicamente um aparato semelhante a uma caixa, cujo tamanho depende do animal a ser analisado e os objetos a serem explorados. A tarefa consiste em analisar a tendência natural do animal em explorar o ambiente e discriminar novidades. Nessa tarefa o animal é apresentado aos objetos idênticos e, posteriormente, na segunda fase o animal é apresentado a um dos objetos apresentado previamente juntamente com um objeto novo. Os objetos são do mesmo tamanho, mas podem ter a forma e/ou cor diferente na segunda fase.

Primeiramente, os animais são habituados ao aparato para a familiarização com o ambiente proporcionando, desta forma, uma diminuição da ansiedade e do estresse que normalmente são observados quando o animal é exposto a um ambiente novo. Posteriormente à familiarização ao aparato, submetem-se os animais a dois testes diferentes: no primeiro, chamado de teste 1 ou sessão de treinamento (treino), os animais são postos no aparato com dois objetos similares que serão explorados durante um dado período de tempo que permita uma exploração suficiente e igual de ambos objetos (fase de apresentação dos objetos); no segundo, conhecido como teste 2 ou sessão de teste (teste), um dos objetos é substituído por um outro, diferente o suficiente para que os animais o percebam e explorem mais este (fase de reconhecimento dos objetos). O intervalo entre o treino e o teste depende do tipo de memória que desejamos

investigar: memória de curta ou longa duração. O tempo que o animal explora cada um dos objetos é registrado para as análises pertinentes ao design do estudo.

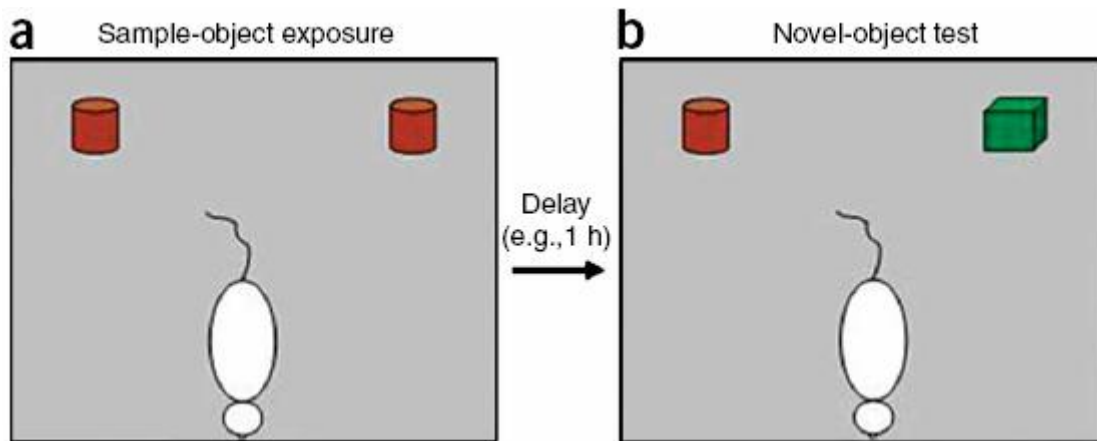


Figura 1. Representação esquemática da tarefa de reconhecimento de objeto; a = treino e b = teste (Bevins e Besheer, 2006).

A popularidade desta tarefa tem aumentado, pois o animal não precisa ser exposto a estímulos aversivos, restrição de água ou de alimentos, não necessita de várias sessões de treino e ainda pode ser facilmente reproduzido em diversos laboratórios, utilizando ratos ou camundongos (Bevins e Besheer, 2006).

A memória de reconhecimento é conhecida como uma memória de trabalho que consiste de dois componentes distintos, o ato de recordar e a familiaridade (Ennaceur e Delacour, 1988; Eichenbaum et al., 2007). Recordar envolve uma recuperação consciente de associações e contexto, enquanto familiaridade é um senso não contextual de uma exposição anterior. As bases anatômicas que envolvem estes processos ainda vêm sendo estudadas, mas a participação do hipocampo parece fundamental (Squire et al., 2007), pois um comprometimento na atividade ou lesão desta região cerebral

prejudica o desempenho da memória na tarefa de reconhecimento de objetos (Clark et al., 2000; Hammond et al., 2004).

Desta forma, esta tarefa experimental de simples execução e que envolve aspectos de locomoção, atenção, aprendizado e memória é bastante útil para avaliação de diversas drogas que atuam sobre o sistema nervoso central e afetam, principalmente, o desempenho cognitivo.

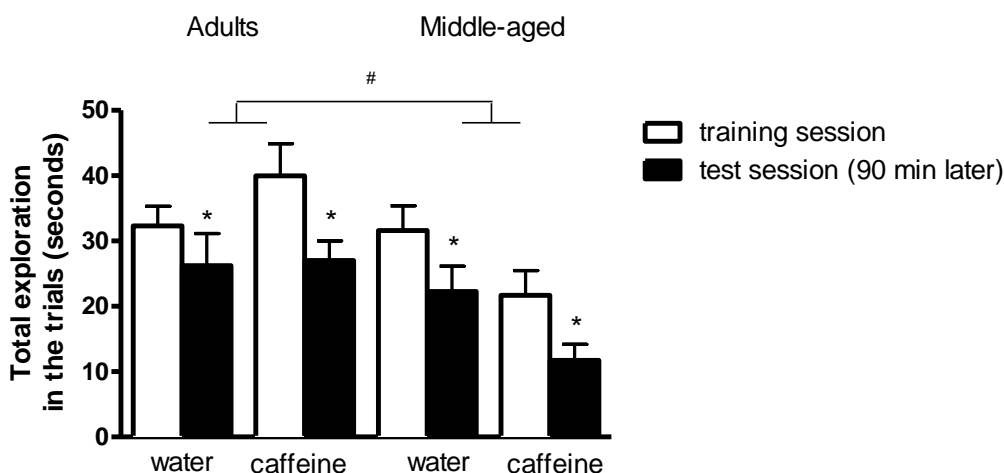
### **Materiais e Métodos**

A tarefa de reconhecimento de objetos foi realizada conforme demonstrado anteriormente (Costa et al., 2008). Foi utilizado um aparato feito de Plexiglas pintado de preto medindo 50 cm × 50 cm cercado por paredes de 50 centímetros de altura. Os animais foram habituados ao aparato durante 5 minutos 24 horas antes da sessão de treino. A sessão de treino consistiu em colocar o animal na arena, contendo dois objetos idênticos para livre exploração por 5 min. Os objetos foram posicionados no centro da arena. A sessão de teste foi realizada 90 minutos após o treino, e dois objetos diferentes estavam presentes, um familiar (um dos objetos usados na sessão de treino) e um novo. Na sessão de teste, ambos os objetos apresentavam texturas, cores e tamanhos semelhantes, mas formatos diferentes. O índice de reconhecimento de objeto foi obtido pela razão  $TN / (TN + TF)$  [TF = tempo de exploração do objeto familiar; TN = tempo de exploração do objeto novo]. Os objetos e o aparato foram limpos com solução de etanol 10% entre treino e teste. A exploração foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz e/ou patas dianteiras.

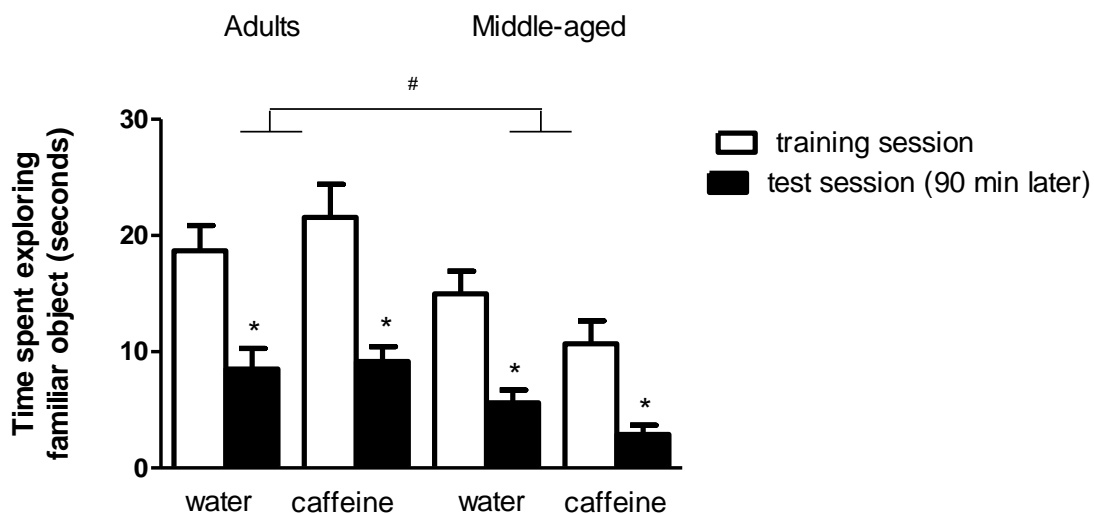


## Resultados

Os efeitos da administração crônica de cafeína foram investigados na tarefa de reconhecimento do objeto que consiste em uma tarefa não aversiva. Para análise do tempo de exploração total em ambos os objetos foi utilizada a ANOVA de três vias (idade  $\times$  tratamento  $\times$  *trials* – como medidas repetidas) que revelou um efeito significativo dos *trials* [ $F(1,58) = 93,262, P < 0,001$ ], mas nenhuma interação significativa entre os *trials* e tratamento (Fig. 2). Como um comportamento normal, os ratos passam menos tempo no objeto familiar e mais tempo no objeto novo na sessão de teste, quando comparado com treino. Análise do tempo de exploração no objeto familiar utilizando a ANOVA de três vias revelou um efeito significativo dos *trials* [ $F(1,58) = 93,262, P < 0,0001$ ], mas nenhuma interação significativa entre *trials* e tratamento (Fig. 3). Para o índice de reconhecimento de objeto, a ANOVA de três vias revelou um efeito significativo dos *trials*, mas nenhuma interação significativa entre os *trials* e tratamento [ $F(1,58) = 107,62, P < 0,0001$ ] (Fig.4). No entanto, os animais tratados com cafeína não mostraram diferenças significativas em comparação ao grupo controle, em ambas as idades. Além disso, os animais de meia-idade apresentaram índices de reconhecimento significativamente maiores em comparação com os adultos.

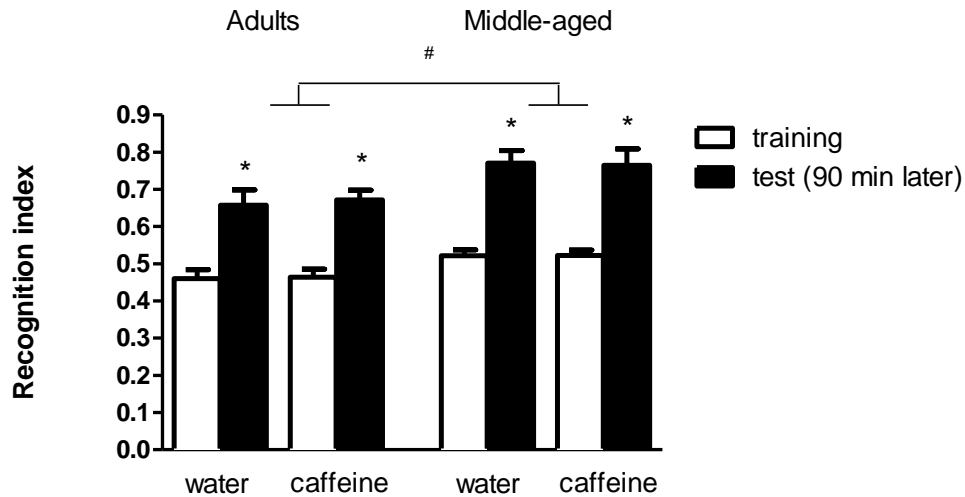


**Figura 2 : Tempo total de exploração dos objetos na sessão de treino e teste.** O gráfico mostra o tempo de exploração (em segundos) dos ratos adultos e de meia-idade que receberam água ou cafeína durante 30 dias (1 mg / mL, na água de beber). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. do tempo gasto em ambos os objetos na sessão de treino e na sessão de teste realizado 90 min mais tarde (n = 15-16 animais para cada grupo). \* P < 0,05, diferença significativa entre treino e teste. # P < 0,05, diferença significativa entre ratos de meia-idade e ratos adultos (ANOVA de três vias).



**Figura 3: Análise do tempo de exploração no objeto familiar.** O gráfico mostra o tempo de exploração (em segundos) do objeto familiar dos ratos adultos e de meia-idade que receberam água ou cafeína durante 30 dias (1 mg / mL, na água de beber). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. do tempo gasto no objeto familiar na sessão de treino e na sessão de teste

realizado 90 min mais tarde (n = 15-16 animais para cada grupo). \* P <0,05, diferença significativa entre treino e teste. # P <0,05, diferença significativa entre ratos de meia-idade e ratos adultos (ANOVA de três vias).



**Figura 4: Index de reconhecimento de objetos.** O gráfico mostra os índices de reconhecimento dos ratos adultos e de meia-idade que receberam água ou cafeína durante 30 dias (1 mg / mL, na água de beber). A sessão de teste foi realizada 90 minutos após o treino. Os resultados são expressos pela média  $\pm$  E.P.M. (n=15-16 por grupo) do índice de reconhecimento obtido pela razão: índice =  $(T_N / T_N + T_F)$ ,  $T_N$  = tempo de exploração do objeto novo;  $T_F$  = tempo de exploração do objeto familiar. \* P <0,05, diferença significativa entre treino e teste. # P <0,05, diferença significativa entre ratos de meia-idade e ratos adultos (ANOVA de três vias).

## Discussão

A memória de reconhecimento confere a capacidade de discriminar entre objetos novos e familiares (Rossato et al., 2007). O reconhecimento de objetos é uma tarefa não aversiva que lida com a motivação natural dos animais para explorar a novidade, um instinto inato que leva os animais a aprender sobre seu ambiente (Costa et al., 2008). Nesta tarefa, não foram encontrados comprometimentos no desempenho de ratos de meia-idade. Esses achados estão de acordo com os encontrados por de La Tremblay e

Plamondon (2011), que não encontraram comprometimento na memória de reconhecimento de ratos de meia-idade quando o teste foi realizado 30 minutos após o treino.

Apesar de muitos estudos avaliarem a memória de longa duração nesta tarefa, a escolha pela memória de curta duração deve-se ao fato de que um maior tempo entre o treino e o teste deteriora o desempenho de reconhecimento do objeto novo, sendo os melhores resultados encontrados entre sessenta a noventa minutos após o treino (de Bruin e Pouzet, 2006; Sik et al., 2003).

De fato, neste estudo, ratos de meia-idade apresentaram índices de reconhecimento maiores quando comparados aos adultos. Inicialmente, esse aumento significativo do índice parece estar relacionado a uma maior exploração por estes animais. No entanto, analisando o tempo total de exploração de ambos os objetos e da sua atividade locomotora, pode-se observar uma diminuição em ambos os parâmetros, sugerindo que esses ratos não apresentaram comportamento de exploração mais elevado do que os adultos. Além disso, a diminuição da locomoção pode estar relacionada com um menor tempo despendido explorando a arena, mas um tempo maior explorando os objetos. Apesar de estudos anteriores demonstrarem que a cafeína pode melhorar a memória de reconhecimento em ratos envelhecidos (Costa et al., 2008), neste estudo, ratos de meia-idade, nesta idade (13 meses de idade), não apresentaram comprometimento na memória de reconhecimento, e assim, o tratamento com a cafeína não modificou o desempenho desses animais.

## Referências

Besheer, J., Bevins, R.A. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory. *Nat. Protoc.* 1: 1306-1311, 2006.

Clark, R.E., Zola, S.M., and Squire, L.R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J. Neurosci.* 20: 8853– 8860, 2000.

Costa, M.S., Botton, P.H., Mioranza, S., Souza, D.O., Porciúncula, L.O. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience*, 153:1071–8, 2008.

de Bruin, N., and Pouzet, B. Beneficial effects of galantamine on performance in the object recognition task in Swiss mice: deficits induced by scopolamine and by prolonging the retention interval. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85: 253-260, 2006.

de la Tremblaye, P.B., Plamondon, H. Impaired conditioned emotional response and object recognition are concomitant to neuronal damage in the amygdala and perirhinal cortex in middle aged ischemic rats. *Behav Brain Res.* 1;219(2):227-33, 2011.

Eichenbaum, H., Yonelinas, A.P., and Ranganath, C. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annual Review of Neuroscience* 30: 123–152, 2007.

Ennaceur, A., Delacour, J. A new one-trial for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31: 47-59, 1988.

Hammond, R.S., Tull, L.E., and Stackman, R.W. On the delaydependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 82: 26–34, 2004.

Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R., Myskiw, J.C., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem.* 14: 36-46, 2007.

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.

Squire, L.R., Zola-Morgan, J.T., and Clark, R.E. Recognition memory and the medial temporal lobe: A new perspective. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 872-883, 2007.