

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**BIOQUÍMICA**

**Tratamento crônico com cafeína durante a adolescência até a vida adulta de ratos**  
**Wistar: efeitos sobre a memória de reconhecimento e a sinalização do fator**  
**neurotrófico derivado do encéfalo**

**FERNANDA DE MEDEIROS FLORES NUNES**

**Orientador(a): Profa. Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula**

**Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas:**  
**Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial**  
**para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.**

**Porto Alegre, 2013**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora, a Prof<sup>a</sup> Lisiane, que mesmo sem me conhecer me recebeu de braços abertos. Obrigada Lisi, por ser uma orientadora tão presente, por todas as críticas, sei que todas elas foram para o meu crescimento e amadurecimento. Obrigada pelo apoio incondicional e por acreditar no meu trabalho.

Gostaria de agradecer ao nosso grupo, a Dani, Ana, Jana, Cássia, Bina, Nati com certeza sem o apoio de vocês, especialmente a Nati e a Bina que além de colegas são amigas e muitas vezes ficaram me ajudando em experimentos noturnos. Obrigada a todas por fazerem da nossa rotina diária muito mais agradável e prazerosa. Com certeza vocês são muito mais do que colegas e sei que a amizade que criamos dentro do grupo vai muito além das portas do laboratório.

Aos colegas do laboratório 28, alunos do professor Diogo, e também aos colegas que dividem o nosso laboratório, aluno do professor Roska, por serem extremamente solícitos quando precisei e por fazerem a nossa rotina mais agradável. Aos colegas do laboratório 24, pela convivência e parceria de sempre.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, pela competência em resolver nossos problemas e por serem acessíveis e prestativos.

À minha família, que além de ser meu porto seguro, me apoiam incondicionalmente para que eu siga os meus sonhos e sei que eles estão muito orgulhosos por eu ter chegado até aqui.

## ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>vii</b>
<b>Introdução</b>	
1.1.Cafeína: Histórico	09
1.2. Cafeína e Receptores de Adenosina	10
1.3. Cafeína e Memória	11
1.4. Cafeína e Efeitos Adversos	13
1.5. Consumo por adolescentes	14
1.6. Cafeína e o Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo	18
<b>Objetivos</b>	
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
<b>CAPÍTULO 1. Artigo Científico</b>	<b>22</b>
<b>Discussão Geral</b>	<b>56</b>
<b>Conclusões</b>	<b>64</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>65</b>

## RESUMO

O consumo de cafeína tornou-se popular em adolescentes devido ao aumento da ingestão de bebidas comercializadas na forma de bebidas energéticas. Alguns estudos consideram que os efeitos benéficos da cafeína são atribuídos a uma reversão dos sintomas de abstinência. Neste estudo, foram investigados os efeitos da administração crônica de cafeína em ratos desde a adolescência (40 dias de idade) até à idade adulta (3 meses de idade) na memória de reconhecimento e BDNF e proteínas relacionadas a sua sinalização nas regiões do córtex e hipocampo. A cafeína (0,3 e 1,0 g/L) foi administrada na água de beber durante o ciclo de ativo dos animais (ciclo escuro) e retirada durante os fins de semana. Este protocolo foi desenvolvido a fim de mimetizar o consumo humano. Para as experiências de privação (abstinência), a administração crônica foi interrompida 24 ou 48 h antes do teste de tarefa de reconhecimento de objetos. Na tarefa de reconhecimento de objetos, foi possível observar os efeitos positivos da cafeína sobre a memória de reconhecimento, pois os animais tiveram um bom desempenho na tarefa. Entretanto, mesmo após a interrupção do tratamento os animais continuaram desempenhando bem a tarefa, dessa forma a abstinência de um tratamento crônico com cafeína não influencia a memória de reconhecimento. A cafeína na sua dose mais alta (1,0 mg / mL) e 24 h após a retirada, causou uma diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo e nenhum efeito sobre as proteínas proBDNF e TrkB. Em contrapartida, no córtex a cafeína em ambas as doses diminuiu os níveis de BDNF, um efeito que persistiu apenas para a dose mais elevada em ambos os tempos de retirada. O ProBDNF teve seus níveis diminuídos pela cafeína (1,0 mg / mL) após 48 horas da retirada, enquanto a cafeína em ambos os tempos de retirada aumentou receptores TrkB. Como mencionado anteriormente, estes resultados mostraram que a cafeína administrada durante a adolescência até a idade adulta, seguida da sua retirada não afeta a memória de reconhecimento. Estes efeitos poderiam ser atribuídos ao desenvolvimento da tolerância por tratamento crônico. Além disso, o aumento de receptores de TrkB seguido por diminuição de BDNF pode ser contribuído para a ausência de efeitos de abstinência de cafeína na memória de reconhecimento.

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

## ABSTRACT

The caffeine consumption has become popular among adolescents due to increased intake of beverages marketed as energy drinks. Some studies consider that the beneficial effects of caffeine are attributable to a reversal of withdrawal symptoms. This study investigated the effects chronic administration caffeine in rats since adolescent period (40 days old) until adulthood (3 months old) on recognition memory and BDNF-related proteins and their signalling in the regions of the cortex and hippocampus. Caffeine (0.3 and 1.0 g/L) was administered in drinking water during the light cycle and discontinued at weekends. This protocol was developed to mimic human consumption. For withdrawal experiments, chronic administration of caffeine was interrupted 24 or 48 h before the test session on object recognition task. In the task, we observed the positive effects of caffeine on recognition memory once that animals learned the task. However, even after treatment interruption animals continued performing the task, so the withdrawal of chronic treatment with caffeine has no effect on recognition memory. Caffeine at its highest dose (1.0 mg / mL) after 24 h and after removal, showed a decrease in BDNF levels in the hippocampus and no effect on protein proBDNF and its receptor TrkB. In contrast, in the cortex caffeine decreased BDNF levels at both doses, an effect which persisted for only the highest dose at both time of withdrawal. ProBDNF levels had decreased by caffeine (1.0 mg / mL) after 48 hours of removal, while the caffeine in both periods of increased withdrawal TrkB receptors. As mentioned earlier, these results showed that caffeine administered during adolescence to adulthood, followed by its removal does not affect recognition memory. These effects could be attributed to the development of tolerance for chronic treatment. Furthermore, the increase of TrkB receptors followed by a decrease in BDNF may be contributed to the absence of withdrawal effects of caffeine in recognition memory.

Keywords: Withdrawal, 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

NGF – Fator de crescimento neuronal

NT – Neurotrofina

proBDNF – Forma precursora o 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

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual está no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo. 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).

Os itens **4 e 5, DISCUSSÃO GERAL e CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, contém interpretações e comentários gerais pertinentes aos resultados apresentados no item 3, e aponta perspectivas para continuidade do trabalho e apresenta as conclusões e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **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) desta dissertação.

# INTRODUÇÃO



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 – Cafeína: histórico

A cafeína é classificada como metilxantina, um alcalóide da família das xantinas encontrada naturalmente em plantas (para revisão ver Fredholm et al., 2011). A origem histórica das metilxantinas é ainda desconhecida e cheia de mitos. Um dos mitos frequentemente mais contados é sobre Kaldi, um pastor etíope (às vezes Árabe), que cuidava de cabras. Certo dia, ele observou que as suas cabras ficavam mais agitadas e de fato, dançavam, quando comiam frutinhas vermelhas de certo arbusto. Após ele mesmo ter experimentado tais frutinhas ele informou ao abade de um mosteiro local o ocorrido e a partir de então começou a conquista pelo território. A história de Kaldi apareceu no primeiro livro de um professor de línguas orientais, porém ainda faltam detalhes sobre essa lenda (Nairon, 1617). Inicialmente os grãos de café eram comidos *in natura*, após começaram a ser moídos e misturados com uma pasta de gordura que era levada em viagens como um lanche estimulante. Existem mais de 60 espécies de plantas que fornecem cafeína, sendo as mais conhecidas o café, chá, cacau, erva mate e o guaraná. O conteúdo de cafeína em diversos produtos e bebidas depende da planta utilizada e do modo de preparo. (Barone e Roberts, 1996).

É interessante destacar que o consumo de café é recente, uma vez que seu uso se tornou mais difundido na Europa em meados do século XVII (Ukers WH, 1922; Weinberg BA e Bealer BK, 2001; Elgklou L, 1993). Posteriormente, foi descoberto que o efeito estimulante do café era devido a um princípio ativo, que mais tarde foi descoberto e denominado de cafeína (Weinberg BA e Bealer BK, 2001).

## 1.2 – Cafeína e receptores de adenosina

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) (Fredholm et al., 1999). 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 et al., 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, dores de cabeça e confusão mental (Nehlig et al., 1992; Daly et al., 1999; Fredholm et al., 1999).

A ação farmacológica da cafeína consiste no bloqueio dos receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  (Fredholm, 1980). A adenosina é considerada um neuromodulador endógeno que controla a liberação de neurotransmissores, a excitabilidade neuronal e o ritmo circadiano (Cunha et al., 2001; Fredholm et al., 2005). Além disso, coordena as respostas da dopamina e outros neurotransmissores em áreas do encéfalo responsáveis pela função motora e aprendizado e memória (Fredholm et al., 2005). 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). A adenosina pode ser formada extracelularmente principalmente pelo metabolismo de liberação de nucleotídeos por uma enzima família de enzimas chamadas ectonucleotidases (Latini et al., 2001). Até o presente momento, as ações

específicas da adenosina no SNC são mediadas por quatro diferentes receptores específicos de adenosina que foram identificados em humanos e animais: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, todos acoplados a proteínas G (Fredholm et al, 1999; Fredholm et al, 2003; Sebastião e Ribeiro, 2009). Os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> acoplados a proteínas G inibitórias enquanto os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> estão acoplados a proteínas G estimulatórias (Fredholm et al., 2001). O receptor adenosinérgico do subtipo A<sub>1</sub> é o mais abundante, principalmente na região do neocórtex, cerebelo, hipocampo e corno dorsal da medula espinhal, enquanto que os receptores do subtipo A<sub>2A</sub> 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). A cafeína também afeta a liberação de cálcio intracelular, interfere nos receptores GABA<sub>A</sub> e inibe a 5'-nucleotidase e fosfatase alcalina, mas isso em concentrações mais elevadas (milimolar) do que as requeridas para o antagonismo do sistema adenosinérgico (micromolar) (Lelo et al., 1986; Kaplan et al., 1989; Denaro et al., 1990; Chou et al., 1992; Benowitz et al., 1995). 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).

### **1.3 – Cafeína e memória.**

#### 1.3.1 - Efeitos neuroprotetores.

Os efeitos neuroprotetores observados pela administração de cafeína são de certa forma muito recentes e parte deles caracterizados farmacologicamente pelo bloqueio dos receptores A<sub>2A</sub>. A manipulação dos receptores de adenosina apresenta efeitos

neuroprotetores em injúrias no SNC (Cunha, 2005; Sebastião e Ribeiro, 2009; Stone et al., 2009). Esses efeitos neuroprotetores foram observados em um estudo onde a ativação dos receptores  $A_1$  é crucial para manter o foco epiléptico restrito, formando uma nova dimensão da importância do receptor  $A_1$  no controle da morte celular excitotóxica e na prevenção da progressão de estado de mal epiléptico de consequências letais (Fedele et al., 2006). Conforme mencionado anteriormente, os efeitos neuroprotetores da cafeína são recentes e foram muito investigados em modelos experimentais da Doença de Parkinson, onde sua administração atenuou a perda de neurônios dopaminérgicos e todos os sintomas motores decorrentes da doença em modelos experimentais (Chen et al., 2001). Além disso, a cafeína foi capaz de reduzir os danos em neurônios nigroestriatais causados pela 6-OHDA (Aguilar et al., 2006; Joghataie et al., 2004). Foi observado que a cafeína apresenta efeitos neuroprotetores contra o déficit mnemônico em modelos experimentais da Doença de Alzheimer (Arendash et al., 2006; Dall Ígna et al., 2007) e demência do tipo esporádica (Espinosa et al., 2013), bem como efeitos preventivos contra o declínio da memória decorrente da idade (Costa et al., 2008a; Prediger et al., 2005; Sallaberry et al., 2013). Parte desses efeitos envolve a participação dos receptores de adenosina  $A_{2A}$  (Canas et al., 2009; Dall Ígna et al., 2007) e também os receptores colinérgicos muscarínicos (Botton et al., 2010). A participação dos receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  nos processos de aprendizado e memória foi investigada pela administração de cafeína ou pelo bloqueio seletivo dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ . O bloqueio seletivo dos receptores  $A_1$  também facilitaram a memória e aprendizagem nas tarefas de esquiva passiva (Kopf, 1999; Nehlig et al., 1992; Suzuki et al., 1993) e esquiva inibitória (Pereira et al., 2002; 2005).

### 1.3.2 – Efeitos sobre a memória em condições fisiológicas normais.

Considerando que o consumo de cafeína é difundido mundialmente, uma série de estudos foi realizada tanto em animais quanto em humanos sobre os efeitos da cafeína no desempenho cognitivo. Grande parte destes estudos estabelece que o consumo baixo a moderado de cafeína melhora o desempenho cognitivo, enquanto outros não encontram diferenças significativas (Angelucci et al., 1999; Childs e de Wit, 2006; Haskell et al., 2005; Heatherley et al., 2005; Jarvis, 1993; Prediger et al., 2005 a,b). Dados do nosso grupo demonstraram que a administração aguda de cafeína em camundongos adultos melhora o desempenho da memória de reconhecimento (Botton et al., 2010; Costa et al., 2008b). De fato, a melhora no desempenho em tarefas de aprendizado e memória pela administração de cafeína parece ser mais restrita na forma aguda e foi observada melhora no desempenho na tarefa de esQUIVA inibitória e no labirinto aquático de Morris (Angelucci et al., 1999; 2002).

## **1.4 – Efeitos adversos**

### 1.4.1 – Classificação dentro das drogas de abuso.

O consumo regular da cafeína é amplamente difundido e sua utilização muitas vezes é associada com o uso de substâncias conhecidas por produzirem dependência e por apresentarem características de drogas de abuso (Morelli e Simola, 2011). A dependência de drogas pode ser definida como a necessidade de manter a ingestão do fármaco a fim de eliminar os sintomas de abstinência. Entretanto, de acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais (DSM-IV), existem

alguns critérios que devem ser preenchidos para que a substância em questão se enquadre no quesito dependência, dentre eles: indução à tolerância, sintomas de abstinência, ingerir a substância por um longo período ou em grandes quantidades, desejo persistente ou esforços mal sucedidos em diminuir ou controlar a ingestão da substância, desistir ou reduzir atividades sociais e recreativas devido ao uso da substância e o uso contínuo a respeito do conhecimento persistente ou recorrente de problemas físicos ou mentais exacerbados pela substância. Considerando os critérios acima apresentados, as metilxantinas não preenchem alguns critérios que poderiam ser enquadrados como abuso (Morelli e Sinola, 2011), mas ainda existem controvérsias (Gilliland e Bullock, 1984; Griffiths et al. 1990; Nehlig, 1999). Apesar da cafeína parcialmente preencher esses critérios, seu consumo é considerado seguro e ela é amplamente aceita como uma “droga atípica de dependência” (Daly e Fredholm, 1998). Ao contrário de outras drogas de abuso nas quais ocorre um aumento ilimitado do uso, um dos efeitos da cafeína é que isso tende a ser auto-regulado (Morelli e Sinola, 2011).

#### 1.4.2 – Abstinência

É amplamente aceito que o consumo regular de cafeína pode levar ao desenvolvimento de tolerância. Goldstein e colaboradores (1964) relataram que a cafeína causa uma menor vigília em indivíduos que tomam café regularmente e relataram um sono menos profundo quando comparados ao grupo placebo. Alguns sintomas de abstinência foram observados quando consumidores regulares de cafeína interrompem de forma abrupta seu consumo. Dentre eles destacam-se: dor de cabeça (com início 12-16 horas após a última ingestão), diminuição no estado de alerta, sono e alterações significativas no estado de humor (Goldstein et al, 1969; Rogers e Smith, 2011; Rogers et al., 2012).

Além das dores de cabeça, a síndrome de abstinência pode causar cansaço, maior irritabilidade e agitação (Dews et al, 1982; Juliano e Griffiths, 2004; Sigmon et al, 2009). É importante ressaltar que todos estes sintomas são revertidos pela ingestão de cafeína (Rogers et al, 2005).

Considerando todos esses sintomas de abstinência, há enorme controvérsia entre os autores sobre os reais os efeitos positivos da cafeína sobre o desempenho cognitivo, pois a argumentação contrária a essa hipótese propõe que a cafeína melhora o desempenho cognitivo por amenizar os sintomas de abstinência que incluem aumento no estado de alerta, diminuição do sono, melhora da velocidade em tarefas que requerem atenção e rápida resposta motora (Childs e de Wit, 2006; Dews et al. 2002; Haskell et al. 2005; Heatherley et al., 2005; Smith et al. 2006). Além disso, a discussão também enfoca os efeitos distintos da cafeína em consumidores regulares e consumidores não habituais. Em recente revisão da literatura Rogers e colaboradores (2012) analisaram uma série de fatores para tentar estabelecer se o consumo de cafeína de fato promove benefícios nas funções cognitivas. Os autores relataram que após um período agudo de abstinência à cafeína, os consumidores de doses médias a altas tiveram um desempenho pior nas tarefas que medem a quantidade de erros quando comparados aos não consumidores ou aos consumidores de doses baixas de cafeína. Além disso, apresentaram uma agilidade mental menor e maior sonolência, corroborando com dados prévios da literatura (Goldstein et al, 1969; Rogers et al, 2003). Estes efeitos observados após a abstinência durante a noite pioraram quando a retirada da cafeína era mantida durante a tarde. Além disso, eles verificaram que os efeitos da cafeína ou da abstinência não melhoram a memória, mas proporcionam maior agilidade e rapidez na execução das tarefas. Os autores também observaram que o

consumo médio a elevado de cafeína promoveu tolerância completa aos seus efeitos para sonolência e estado de alerta diurnos e também para os efeitos ansiogênicos, mas nenhuma tolerância para os efeitos sobre a velocidade motora e resistência (Rogers et al., 2012). Os autores ainda recomendam que os usuários crônicos devam evitar esses efeitos adversos da abstinência como o aumento da sonolência que acarreta em diminuição da concentração e do estado de alerta e, conseqüentemente, prejuízo nas funções cognitivas.

Por outro lado, os consumidores eventuais ou não consumidores (aqueles que ainda não desenvolveram tolerância) experimentam um aumento de ansiedade/nervosismo após a ingestão de cafeína, que diminui com o passar do tempo. Os autores ainda discutem que apesar desse efeito ansiogênico, o benefício para aumento na agilidade e desempenho mental compensaria. Finalmente, contextos em que consumidores eventuais ou não consumidores poderiam fazer bom uso deste último efeito, seriam, por exemplo, quando se tenta permanecer acordado à noite, durante uma viagem de carro de longa distância ou tentando combater a pressão para dormir decorrente restrição do sono. Em contrapartida, foi relatado em um estudo realizado com humanos, que a abstinência da cafeína afeta o humor e o tempo de resposta em tarefa que mede o número de erros, mas que a atenção seletiva e a memória não foram afetadas (Addicott e Laurienti et al, 2009).

Como mencionado anteriormente, a cafeína é uma substância psicoativa com a capacidade de melhorar o desempenho dos animais nas tarefas de memória e aprendizagem. Em contrapartida, a sua retirada pode produzir déficits prejudicando o desempenho desses animais em tarefas de memória (Khalig et al, 2012). Estudos relatam que a retirada da cafeína é capaz de diminuir a atividade locomotora dos



animais (Griffins e Woodson, 1988; Nehlig e Debry, 1994), mesmo durante um tratamento crônico (Finn e Holtzmann, 1986). Além disso, foi descrito que a magnitude desses efeitos depende da quantidade de cafeína ingerida, uma vez que baixas doses restauram essa hipolocomoção (Fredholm, 1999). Além disso, foi demonstrado que a abstinência de cafeína é capaz de afetar negativamente a memória espacial dos animais, no labirinto aquático de Morris, além de aumentar a imobilidade (Khalig et al, 2012). Contudo, a retirada da cafeína faz com que os animais evitem sabores novos em testes de exposição a sabores condicionados (Dreumont-Boudreau et al, 2008; Vittielo et al, 1977).

### **1.5 – Consumo pela população adolescente.**

O consumo de cafeína se tornou popular entre os jovens devido ao aumento da ingestão de bebidas comercializadas na forma de bebidas energéticas, nas quais são encontradas grandes quantidades de cafeína, taurina, extrato de guaraná, açúcar, extrato de *ginseng* entre outras. Os maiores efeitos adversos são encontrados naquelas que contém maiores quantidades de cafeína e açúcar (Clauson et al., 2008). Inclusive algumas marcas de bebidas energéticas contêm cafeína equivalente a 1-3 xícaras de café e isso tem trazido grande preocupação em relação à saúde e bem-estar (Toblin et al, 2012; Rath et al, 2012) porque permanece ainda desconhecido se o consumo de cafeína durante a adolescência poderia afetar funções cognitivas na idade adulta. Outros dados da literatura demonstraram a presença de sintomas de abstinência em recém-nascidos de mães que ingeriram grandes quantidades de café diariamente (McGowan et al., 1988; Martín et al., 2007). Além disso, estudos relatam um aumento dos sintomas de

abstinência a cafeína por adolescentes (Bernstein et al. 2002), pois a busca pelos seus efeitos positivos aumentou também a procura pelo seu consumo nessa população.

### **1.6 – Cafeína e o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF).**

Os fatores neurotróficos ou neurotrofinas são fundamentais para o perfeito funcionamento e desenvolvimento do sistema nervoso central, sendo fundamentais 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). Dados da literatura demonstram a necessidade de alguns fatores neurotróficos para regular a plasticidade sináptica no período pós-natal (Gyárfás et al., 2010; Zhu et al., 2004). Muitas proteínas com atividade neurotrófica são conhecidas, entre elas, o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4/5 (NT-4/5). Dentre as neurotrofinas, o BDNF é abundantemente expresso no encéfalo durante o desenvolvimento e na idade adulta (Murer et al., 2001). 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).

O BDNF é inicialmente sintetizado como um precursor, pró-BDNF, resultante da clivagem proteolítica intracelular, no entanto também pode ser secretado como pró-BDNF e ser clivado extracelularmente resultando o BDNF. 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). As funções das neurotrofinas resultam da ativação de distintos receptores de membrana: o receptor p75NTR (*p75 neurotrophin receptor*) e os receptores com atividade tirosina cinase 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, (Klein et al., 1990; Soppet et al., 1991; Lamballe et al., 1991).

O BDNF tem seus efeitos mediados principalmente pelo seu receptor de alta afinidade, o receptor tirosina cinase B (TrkB), somente esta isoforma completa possui o domínio intracelular tirosina cinase que quando fosforilado, após a ligação com o 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).

Os efeitos produzidos pelo BDNF podem variar conforme a fase do desenvolvimento. Durante a fase embrionária, o BDNF é necessário para a formação e maturação dos neurônios. Já na fase adulta, tem papel fundamental no processo de consolidação da memória episódica (Barboza, 2009), sendo também é essencial para eventos de plasticidade neuronal e funções importantes como o aprendizado e memória (Tyler et al., 2002). O bloqueio da sinalização do BDNF compromete a persistência da memória (Alonso et al., 2002, 2005; Bekinschtein et al., 2007). Estudos em ratos tem elucidado a

importância do aumento da expressão do BDNF, 12 horas após o treino, no processo de armazenamento e de persistência da memória da longa duração (LTM), utilizando a tarefa de esQUIVA inibitória (Bekinschtein et al., 2007; 2008). Em contrapartida, a depleção do BDNF após o nascimento resulta em uma 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).

Estudos prévios demonstraram que os receptores de adenosina  $A_{2A}$  podem ter seus efeitos protetores via a potencialização das vias de sinalização operadas pelo BDNF e assim, facilitando a transmissão sináptica no hipocampo (Diógenes et al., 2004; Stone et al., 2009). Além disso, estudos prévios demonstraram a adenosina via ativação dos receptores  $A_{2A}$  são capazes de ativar receptores TrkB e, deste modo, exercer um efeito trófico por meio dos receptores tirosina cinase e que a função dos receptores TrkB é modulada pela ativação de receptores de adenosina  $A_{2A}$  (Lee e Chao, 2001; Diógenes et al., 2004; Assaife-Lopes et al., 2010). Ambos receptores ( $A_{2A}$  e TrkB) foram co-immunoprecitados sugerindo uma forte proximidade e isso justificaria a capacidade da adenosina ativar o receptor TrkB na ausência do BDNF (Lee e Chao, 2001). Dados do nosso grupo demonstraram que a administração aguda de cafeína em camundongos adultos melhora o desempenho da memória de reconhecimento, juntamente com um aumento do imunoconteúdo de BDNF e seu receptor TrkB (Costa et al., 2008b), além de restaurar a memória de animais de meia-idade acompanhada de alterações dos níveis de BDNF (Costa et al., 2008a; Sallaberry et al., 2013). Evidenciando a hipótese de que o BDNF contribui para os efeitos pró-cognitivos da cafeína, capaz de melhorar a memória dos animais e restaurar a memória de animais envelhecidos.

## OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Considerando os efeitos controversos da administração de cafeína sobre as funções cognitivas e o aumento no consumo dessa substância pela população adolescente, o objetivo inicial desse trabalho foi verificar o efeito da cafeína sobre desempenho dos animais na tarefa de reconhecimento de objetos, conjuntamente com a análise do imunocontéudo de BDNF e proteínas pertencentes a sua sinalização.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os efeitos da administração crônica de cafeína bem como da sua retirada (abstinência) na avaliação da atividade locomotora e exploratória em arena de campo aberto;
- Verificar os efeitos da administração crônica de cafeína bem como da sua retirada (abstinência) na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Analisar os efeitos da administração crônica de cafeína bem como da sua retirada (abstinência) sobre o imunocontéudo das proteínas BDNF, TrkB e proBDNF, no hipocampo e no córtex;

## ARTÍGO CIENTÍFICO

Manuscrito em preparação para se submetido a revisão por periódico de circulação internacional.

Caffeine administration during adolescence up to adulthood: effects of withdrawal on recognition memory and BDNF signaling.

Fernanda Nunes, Natália Pagnussat, Sabrina Mioranza, Andréia Rocha, Diogo O. Souza, Lisiane O. Porciúncula\*.

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

\*Correspondent author.

Lisiane O. Porciuncula

Laboratory of Studies on the Purinergic System

Department of Biochemistry

Health and Basic Sciences Institute

Federal University of Rio Grande do Sul

Porto Alegre/RS

Brazil

90035 003.

e-mail.: [loporciuncula@yahoo.com](mailto:loporciuncula@yahoo.com)

Phone.: + 55 51 3308 5556/5557

Fax.: + 55 51 3308 5540

## Abstract

The caffeine consumption has become popular among adolescents due to increased intake of beverages marketed as a form of energy drinks. Some studies consider that the beneficial effects of caffeine are attributable to a reversal of withdrawal symptoms. This study investigated the effects of administration of caffeine in rats (40 days old) until adulthood (3 months old) on recognition memory and BDNF-related proteins and their signalling in the regions of the cortex and hippocampus. Caffeine (0.3 and 1.0 g/L) was administered in drinking water during the light cycle and discontinued at weekends. This protocol was developed to mimic human consumption. For experiments withdrawal, caffeine treatment was interrupted 24 or 48 h before the test session on object recognition task. In the task, we observed the positive effects of caffeine on recognition memory once that animals learned the task. However, even after treatment interruption animals continued performing the task, so the withdrawal of chronic treatment with caffeine has no effect on recognition memory. Caffeine at its highest dose (1.0 mg / mL) after 24 h and after removal, showed a decrease in BDNF levels in the hippocampus and no effect on protein proBDNF and its receptor TrkB. In contrast, in the cortex caffeine decreased BDNF levels at both doses, an effect which persisted for only the highest dose at both time of withdrawal. ProBDNF levels had decreased by caffeine (1.0 mg / mL) after 48 hours of removal, while the caffeine in both periods of increased withdrawal TrkB receptors. As mentioned earlier, these results showed that caffeine administered during adolescence to adulthood, followed by its removal does not affect recognition memory. These effects could be attributed to the development of tolerance for chronic treatment. Furthermore, the increase of TrkB receptors followed



by a decrease in BDNF may be contributed to the absence of withdrawal effects of caffeine in recognition memory.

## Introduction

Caffeine is the most psychoactive substance widely consumed in the world. The pharmacological action of caffeine consists in antagonizing endogenous adenosine at A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors (Fredholm, 1999). Adenosine is a nucleoside that exerts two parallel modulatory roles in the central nervous system (CNS), acting as a homeostatic modulator and also as neuromodulator controlling neurotransmitter release, neuronal excitability and circadian rhythm.

The chronic consumption of caffeine has been described to prevent mnemonic deficits in experimental models of Alzheimer's disease (Arendash et al., 2006; Dall'Igna et al., 2007; Espinosa et al., 2013) and also age-related cognitive decline (Costa et al., 2008; Prediger et al., 2005; Sallaberry et al., 2013). These beneficial properties of caffeine were also reported in epidemiological studies (Maia and Mendonça, 2002; Ritchie et al., 2007).

The cognitive enhancer properties of caffeine have been described in behavioral tasks used to evaluate learning and memory in rodents (Angelucci et al., 1999; 2002; Castellano, 1976, Kopf et al., 1999, Pare, 1961; Roussinova and Yonkov, 1976). However, these effects have been challenged in human subjects for some reasons. Firstly, cognitive benefits of caffeine were observed in acute administration and the potential for tolerance develops after repeated frequent exposure (Robertson et al., 1981; Evans and Griffiths, 1992; Griffiths and Mumford, 1996). Additionally, some effects are frequently confounded with the ability of caffeine in increasing attention/vigilance and physical performance (Burke, 2008; Rogers et al., 2003; Smith et al., 2006). Besides, distinct responses for caffeine can be observed when comparing low and high consumers (James and Rogers, 2005), especially when considering

withdrawal symptoms that include tiredness/fatigue, sleepiness/drowsiness, dysphoric mood, difficulty concentrating/decreased cognitive performance and irritability (Griffiths et al., 1990; Juliano and Griffiths, 2004; Rogers et al., 2012).

Currently, the consumption of caffeine by adolescents and young adults around the world is growing (Bernstein et al., 2002; Malinauskas et al., 2007; Oddy and O'Sullivan, 2009) due to the increased intake of energy drinks, whose main active ingredient is caffeine (Clauson et al., 2008; Rath 2010). Besides, the search for better cognitive performance among college students along with shifting in the circadian rhythm also contributes for increased caffeine consumption.

Chronic and acute administration of caffeine has promoted modification in the hippocampal levels of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF). BDNF is a neurotrophin synthesized as a glycosylated precursor proBDNF, which is further posttranslationally converted to mature BDNF (Matsumoto, 2008; Yang 2009). Mature BDNF interacts preferentially with TrkB receptor to activate its intrinsic tyrosine kinase activity, triggering multiple cell signaling related to survival, maturation and differentiation of neurons (Lee and Chao, 2000; Greenberg, 2009; Chen JF, 2010; Yang, 2009; Woo, 2005). In particular, BDNF-driven signaling is critical for synaptic plasticity, learning activity and memory processing in the adult brain (Alonso et al., 2002; Chen et al., 2010b; Tyler et al., 2002), including the persistence of long-term memory in rats (Bekinschtein et al., 2007; 2008).

Data from our group revealed that caffeine increase hippocampal BDNF along with an improvement in the recognition memory in adult mice (Costa et al., 2008b), but chronic treatment did not cause any effect on BDNF levels and aversive memory (Sallaberry et al., 2013).

Caffeine is considered a safe substance, but different from other psychostimulants, it is unknown if caffeine consumption during adolescence could produce long lasting changes in brain structure and function that endure into adulthood (Carlezon and Konradi 2004; Chambers et al. 2003; Laviola et al. 1999), (Toblin, 2012; Rath, 2012). Nevertheless, the effects of caffeine withdrawal after a chronic schedule were not investigated on recognition memory and BDNF signaling. Thus, the aim of this study was evaluate if caffeine administered during adolescence up to adulthood could promote changes in the recognition memory and BDNF signaling. Besides, we also decide to explore if the performance in the object recognition task could be affected by caffeine withdrawal. It is important to known if this psychostimulant consumed worldwide could affect adaptations in brain anatomy and function that are characteristic of normal development during this period.

## Materials and Methods

### Animals

Adolescent male Wistar rats (35-40 days old) from our own breeding colony were used in the study. All efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of subjects. The project was approved by the ethical committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul and experimental procedures were performed according to the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals as well as the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior recommendations for animal care. Animals were maintained in standard animal housing conditions, on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.), five/cage, with food and water ad libitum. All behavioral tests were performed between 5:00 p.m. and 8:00 p.m.

## Caffeine Administration

Adolescent rats (35-40 days old) received caffeine solution (0.3 or 1.0 mg/mL) in tap water during 50 days. The caffeine solution was daily prepared and available for the animals from 6:00 p.m. to 8:00 a.m. In order to mimic human intake, the treatment was interrupted at weekends, with the last administration on Friday night. The doses correspond to a moderate and high human intake with meaningful effects believed to be restricted adenosine receptors (Freedholm, 1999). For withdrawal experiments, caffeine treatment was interrupted 24 or 48 hours before object recognition task. Importantly, the withdrawal protocols were not performed immediately after weekends.

## Behavioral Tests

*Open field:* Fifty days after the beginning of treatment, rats were submitted to the open field test to evaluate vertical exploration and locomotion. The apparatus was made of black-painted Plexiglas measuring 50 x 50 cm and was surrounded by 50 cm high walls. Each rat was placed in the center of the arena for 10 minutes and number of rearing was manually recorded as an index of exploration. The time spent in both objects during the training session of the novel object recognition task was used as an index of locomotor activity. The experiments were conducted in a sound-attenuated room under low-intensity light (12 lux); exploration was analyzed by two observers blind to the treatments.

*Novel object recognition task:* The object recognition test was carried out 24 hours after habituation in the open field apparatus. Rats first underwent a training session, in which two identical objects were placed near the two corners at either end of one side of the chamber. Rats were placed individually into the open field facing the center of the

opposite wall and allowed to explore the objects during 5 minutes. The test session was performed 90 minutes after training and two dissimilar objects were presented, a familiar one and a novel one. Exploration was defined by directing the nose to the object at a distance of at least 2 cm and/or touching the object with the nose or forepaws. Rearing on to object was not considered exploratory behavior. The novel object recognition index was defined as:  $TN / (TN + TF)$ , [TN = time spent exploring the novel object; TF = time spent exploring familiar object] and was ranked manually by 2 observers blind to treatments. Importantly, the animals were independent groups for both times of withdrawal.

### Immunoblotting

After behavioral tests, rats were sacrificed by decapitation after anesthesia and the whole hippocampus and cortex were dissected out and homogenized in 5 % SDS with a protease inhibitor cocktail (Sigma, São Paulo, SP/Brazil). Homogenates were frozen and kept at -70° C. After defrosting, the protein content was determined by bicinchoninic acid assay (BCA from Pierce, São Paulo/Brazil), using bovine serum albumin (BSA) as standard. Hippocampus and cerebral cortex extracts were diluted to a final protein concentration of 2 mg/ml in SDS-PAGE buffer and 40 µg were applied of protein and dual color pre stained molecular weight standards were separated by SDS-PAGE. BDNF and proBDNF were separated at 14 % and TrkB at 8 % and all samples were 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: 500, Sigma, São Paulo, Brazil), rabbit anti-proBDNF antibody (1: 1000, Sigma, São Paulo, Brazil) and with rabbit anti-TrkB

antibody (1: 1000; Abcam, São Paulo/Brazil). As an additional control for protein loading, membranes were incubated with mouse anti- $\beta$ -tubulin antibody (1: 1000; Santa Cruz, São Paulo/ Brazil). Membranes were also stained with Ponceau S. After incubation with primary antibodies, membranes were washed and incubated with horseradish-peroxidase conjugated secondary antibodies for 1 hour at room temperature and developed with ECL kit (Amersham, São Paulo/Brazil). The autoradiography films were scanned and densitometry analyses performed by using the 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

Two-way ANOVA was used for open field analysis. Two-way ANOVA with repeated measures for trials and treatments as factors were used for novel object recognition data. Data from immunoblotting were separately analyzed according to the time of withdrawal by using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test. Data were expressed as means + SEM and differences were considered statistically significant for  $p < 0.05$ . Graph pad prism was the software used.

### Results

#### *Open Field*

The number of rearings was recorded during 10 minutes of exploration in the open field arena. Two-way ANOVA revealed no significant differences between groups for 24 h [F (2,34) = 0.14532;  $p = 0.86527$ ] and 48 h of caffeine withdrawal [F (2,57) = 0.37320;  $p = 0.69020$ ] (Figs. 1 A and B). The total exploration in both objects was not affected by caffeine withdrawal 24 h [F (2,34) = 0.32919;  $p = 0.72177$ ] and 48 h [F (2,57) =

1.3817;  $p = 0.25943$ ]. Thus, caffeine withdrawal did not modify either exploratory or locomotor activity of the animals (Fig. 1 C and D).

#### *Novel object recognition task*

The influence of chronic treatment of caffeine from adolescence period up to adulthood and its withdrawal was evaluated in the novel object recognition task. Two-way ANOVA revealed only a significant effect of trials for 24 h [ $F(1,35) = 13.652$ ;  $p = 0.00075$ ] and 48 h [ $F(1,56) = 11.119$ ;  $p = 0.00153$ ]. These data revealed that recognition memory assessed in the adulthood was not affected by caffeine consumption started during adolescence period. Besides, the withdrawal protocol did not affect recognition memory (Figs 2A and B).

#### *Immunoblotting*

Analysis of BDNF, proBDNF and TrkB receptor were performed in the whole hippocampus and cerebral cortex. Caffeine when continuously administered during adolescence period up to adulthood did not modify BDNF immunocontent in the hippocampus (Fig. 3A). However, BDNF was decreased after 24 h of withdrawal and returned to basal levels after 48 h of withdrawal (Fig. 3A). These modifications in the BDNF levels were not accompanied by proBDNF, since in both doses and times of withdrawal did not change proBDNF in the hippocampus (Fig. 3B). Besides, TrkB immuncontent was also not modified by caffeine and withdrawal (Fig. 3C).

Caffeine treatment and withdrawal caused markedly modifications in BDNF from cerebral cortex (Fig. 4A). Caffeine (0.3 and 1.0 mg/ mL) continuously administered decreased BDNF in both doses (35 and 57 %, respectively, compared to water-treated rats) (Fig. 4A, grey bars). The decreased BDNF persisted for the highest dose even after



24 and 48 h of withdrawal (44 and 57%, respectively) (Fig. 4A, white bars). Although there was a trend toward decrease in the proBDNF immunocontent in all animals that received caffeine, only caffeine (1.0 mg/mL) with 48 h of withdrawal have reached statistical significance (50 % decrease compared to water-treated rats) (Fig. 4B). There was a trend toward increase in the immunocontent of TrkB receptor in animals that received caffeine (1.0 mg/mL) (Fig. 4C; grey bars). The interruption of caffeine treatment for 24 and 48 h caused a markedly increase in TrkB receptors of the cerebral cortex (68 and 82 %, respectively, compared to water-treated rats) (Fig. 4C; white bars).

## Discussion

In this study, the long lasting effects of caffeine and its withdrawal from adolescence up to adulthood were evaluated on recognition memory using novel object recognition task, along with BDNF and related proteins.

Prior to interpreting these data with regard to effects on recognition memory, it is important to rule out several possible confounding effects. Although caffeine acutely administered could alter locomotion (El Yacoubi et al., 2000) as well as the withdrawal (Finn and Holtzman 1986; 1987), this does not appear to be the case since all animals exhibited nearly identical amounts of time exploring objects during training and test session independent of treatment. Likewise, it is also unlikely that the present findings were confounded by the anxiogenic effects of caffeine because the task was specifically chosen to minimize stress and caffeine-treated rats did not differ from controls with regard to locomotor activity; in fact, activity was remarkably similar across all groups.

In this study, recognition memory assessed in the adult rats was not affected by exposure to moderate and high doses of caffeine started during adolescence and lasted to adulthood. Another novel finding that emerged from this study involves the absence

of alterations by withdrawal. These effects could be attributed to the development of tolerance; indeed, studies performed with chronic administration in the drinking water are considered an established method for obtaining caffeine-tolerant adult rats (Hotlzmann, 1983; 1988; Rhoads, 2011). In humans, caffeine withdrawal is associated to negative effects likewise greater headache, increased feelings of tension, mood alterations and reduced alertness (James, 2005). Differently from memory tasks, while the other symptoms are difficult to record in animals, the advantage to better control the schedule of administration can be achieved in rodents. The schedule used here was designed to mimic human consumption with caffeine being available only at night avoiding possible disruptions in the circadian cycle of the animals.

The absence of improvement on memory reinforces previous findings that enhancement seems to be restricted to acute rather than chronic administrations of caffeine (Angelucci et al., 1999; Botton et al., 2010; Costa et al., 2008a; Sallaberry et al., 2013). In the context of the present study, the administration of caffeine started during adolescence did not cause any effect on recognition memory in the adulthood; otherwise adolescent rats treated with caffeine (3 mg/kg) only during this period of brain development displayed decrement in the recognition memory in adulthood (Pires et al., 2010). Probably, caffeine continuously administered could offset decrements in the performance of object recognition task observed during adolescence period.

Alterations in the BDNF and related proteins may help to explain the effects of caffeine. Firstly, the major alterations in BDNF and related proteins were found in the cortex instead of hippocampus; indeed BDNF was decreased in the hippocampus only for caffeine at the highest dose and after 24 h of withdrawal. Previous studies showed that caffeine reversed age-related recognition memory impairment and the increase in the hippocampal BDNF by aging (Costa et al., 2008a; Sallaberry et al., 2013). These

findings suggest that decreases in the hippocampal BDNF caused by caffeine may contribute for its beneficial or absence of the effects on recognition memory; in fact when caffeine decreased BDNF in the hippocampus none detrimental effect was observed on recognition memory independent on age and schedule of administration. This differential effect between memory and BDNF seems to be restricted to caffeine since other psychostimulants also decreased BDNF expression and levels, but they usually disrupted memory in adolescent animals (Banerjee et al., 2009; Scherer et al., 2010).

The dentate gyrus and perirhinal cortex are integral to the process of recognition memory; the perirhinal cortex is critically involved in discrimination of familiarity whereas the hippocampus appears to support contextual memory, but may not be necessary for familiarity discrimination (Balderas et al., 2008; Gaskin et al., 2011; Song et al., 2011). Given the difficulty in dissected out perirhinal cortex, BDNF and related proteins were immunodetected in the whole cerebral cortex. Caffeine in both doses decreased cortical BDNF and this effect persisted after withdrawal at the highest dose, an effect in a such way similar to hippocampus. Overall, caffeine-treated rats presented a trend for decrease in proBDNF, which might help to explain decreased BDNF over the time, even though only the withdrawal had statistically been significant. These modifications involving mature BDNF and proBDNF helps to explain the effects of caffeine for some reasons. Caffeine decreased proBDNF and uncleaved proBDNF can be considered as a negative regulatory mechanism for brain plasticity since it enhances long-term depression (LTD) through p75NTR and leads to apoptosis (Barnes and Thomas, 2008; Lee et al., 2001; Rosch et al., 2005; Woo et al., 2005). Additionally, mature BDNF binds to TrkB receptor and facilitates pro survival effects, induces and is sufficient for long-term potentiation (LTP) (Chen et al., 1999; 2010; Figurov et al.,

1996; Kang et al., 1997; Pang et al., 2004). While caffeine decreased cortical BDNF, an increase in the TrkB receptors was observed after withdrawal, and a trend for increase was observed for continuous administration at the highest dose. TrkB receptors are usually internalized and rapidly degraded following activation by BDNF (Silhol et al., 2008).

It is also conceivable that increases in the immuncontent of this receptor could be contributed for the absence of effects of caffeine withdrawal on recognition memory, which technically facilitates recognition by the antibody and possibly by the endogenous ligand as well (Silhol et al., 2008; Tapia-Arancibia et al., 2008). The alterations found in the whole cortex could also be derived from the active engagement of the perirhinal cortex during the test phase of the object recognition task.

The signaling operated by BDNF is essential for many types of memory formation (Alonso et al., 2002; Bekinschtein et al., 2007; Choi et al., 2010; Mizuno et al., 2003). More recently, studies have showed that disruption in the BDNF signaling worsened performance in the recognition memory (Callaghan and Kelly, 2012; Seoane et al., 2011). In our study, the modifications found in BDNF and related protein suggests that caffeine withdrawal is able to cause adaptive changes in the brain without decrement on recognition memory. Importantly, if caffeine treatment during adolescence period was able to disrupt recognition memory (Pires et al., 2010), this effect was not further detected by continuous administration. Our data also support that at least for recognition memory the effects of caffeine could not be attributed to any reversion of withdrawal, since chronic treatment followed or not by withdrawal did not interfere with recognition memory.

## References

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

Angelucci, M.E. Cesario, C. Hiroi, R.H. Rosalen, P.L. Cunha, C. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35 (2002) 1201–1208.

Alzoubi KH, Srivareerat M, Aleisa AM, Alkadhi KA (2012) Chronic Caffeine Treatment Prevents Stress-Induced LTP Impairment: the Critical Role of Phosphorylated CaMKII and BDNF. *J Mol Neurosci.*[Epub ahead of print]

Alonso M, Vianna MR, Depino AM, Mello e Souza T, Pereira P, Szapiro G, Viola H, Pitossi F, Izquierdo I, Medina JH (2002) BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation., *Hippocampus*. 12(4):551-60.

Bairam A, Kinkead R, Lajeunesse Y, Joseph V (2010) Neonatal caffeine treatment does not induce long-term consequences on TrkB receptors or BDNF expression in chemosensory organs of adult rats. *Neuroscience Letters* 468: 292–296.

Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Salgado-Tonda P, Chavez-Hurtado J, McGaugh JL, Bermudez-Rattoni F (2008) The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn Mem* 15: 618–624.

Banerjee PS, Aston J, Khundakar AA, Zetterström TS (2009) Differential regulation of psychostimulant-induced gene expression of brain derived neurotrophic factor and the immediate-early gene Arc in the juvenile and adult brain. *Eur J Neurosci.* 29(3):465-76.

Barnes P, Thomas KL (2008) Proteolysis of proBDNF Is a Key Regulator in the Formation of Memory. 3(9): e3248.

Bernstein GA, Carroll ME, Thuras PD, Cosgrove KP, Roth ME (2006) Caffeine dependence in teenagers. *Drug Alcohol Depend.* 66(1):1-6.

Botton PH, Costa MS, Ardais AP, Mioranza S, Souza DO, da Rocha JB, Porciúncula LO (2010) Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behav. Brain Res.* 214, 254e259.

Burke LM. Review Caffeine and sports performance (2008) *Appl Physiol Nutr Metab.* 33(6):1319-1334.

Callaghan CK and Kelly AM (2012) Differential BDNF signaling in dentate gyrus and perirhinal cortex during consolidation of recognition memory in the rat. *Hippocampus* 22: 2127–2135.

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

Chen LY, Rex CS, Sanaiha Y, Lynch G, Gall CM (2010) Learning induces neurotrophin signaling at hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107: 7030e7035.

Choi DC, Maguschak KA, Ye K, Jang SW, Myers KM, Ressler KJ (2010) Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2675–2680.

Clauson KA, Shields KM, McQueen CE, Persad N (2008) Safety issues associated with commercially available energy drinks. *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 48(3):e55–e63; quiz e64–e67.

Costenla AR, Cunha RA, de Mendonça A (2010) Caffeine, Adenosine Receptors, and Synaptic Plasticity. *JAD* 20: S25–S34.

Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Souza DO, Porciúncula LO (2008a) Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience* 153: 1071e1078.

Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Ardais AP, Moreira JD, Souza DO, Porciúncula LO (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.* 53:89e94.

Cunha RA (2001) 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.

Cunha RA (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: from A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signal*. 1: 111e134

Cunha RA (2008) Different cellular sources and different roles of adenosine:A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volumetransmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity. *Neurochem Int* 52: 65–72.

Cunha RA, Agostinho PM (2010) Chronic Caffeine Consumption Prevents Memory Disturbance in Different Animal Models of Memory Decline. *JAD* 20:S95–S116.

Cunha C, Brambilla R, Thomas KL (2010) A simple role for BDNF in learning and memory *Front.Mol.Neurosci*.3:1-14

Diógenes MJ, Fernandes CC, Sebastião AM, Ribeiro JÁ (2004) Activation of Adenosine A2A Receptor Facilitates Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulation of Synaptic Transmission in Hippocampal Slices. *The Journal of Neuroscience*, 24(12):2905–2913.



Eskelinen MH, 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. *JAD* 16: 85e91.

Evans SM, Griffiths RR (1997) Caffeine tolerance and choice in humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 108(1-2): 51-59.

Finn IB e Holtzman SG (1986) Tolerance to caffeine-induced stimulation of locomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 238:542–546.

Finn IB, Holtzman SG (1987) Pharmacologic specificity of tolerance to caffeine-induced stimulation of locomotor activity. *Psychopharmacology* 93:428-434

Fredholm BB Bättig K Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE (1999) Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacol Rev* 51:83-133.

Gaskin S, Tardif M, Mumby DG (2011) Prolonged inactivation of the hippocampus reveals temporally graded retrograde amnesia for unreinforced spatial learning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 96(2): 288–296.

Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL (2009) New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J. Neurosci.* 29:12764e12767.

Griffiths RR, Mumford GK (1996) Caffeine reinforcement, discrimination, tolerance, and physical dependence in laboratory animals and humans. In: Schuster CR, Kuhar MJ, editors. Pharmacological aspects of drug dependence: toward an integrated neurobehavioral approach (Handbook of Experimental Pharmacology) Springer; Berlin Heidelberg, New York: 315–341.

Holtzman SG (1983) Complete, reversible, drug-specific tolerance to Stimulation of locomotor activity by caffeine. *Life Sciences* 33:779-787.

Juliano LM, Griffiths RR (2004) A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. *Psychopharmacology* 176: 1–29.

James JE, Rogers PJ (2005) Effects of caffeine on performance and mood: withdrawal reversal is the most plausible explanation. *Psychopharmacology* 182:1–8.

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

Lee FS, Chao MV (2001) Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98: 3555e3560.

Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD (2012) Epigenetic regulation of *bdnf* gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci.* 28(42): 10576–10586.

Malinauskas BM, Aeby VG, Overton RF, Carpenter-Aeby T, Barber-Heidal K (2007) A survey of energy drink consumption patterns among college students. *Nutr J.* 6: 35.

Maia L, de Mendonca A (2002) Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur. J. Neurol.* 9:377e382.

Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA (2008) Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat. Neurosci.* 11: 131e133.

Mizuno M, Yamada K, He J, Nakajima A, Nabeshima T (2003) Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn Mem* 10:108–115.

Mumford GK, Neill DB, Holtzman SG (1988) Caffeine elevates reinforcement threshold for electrical brain stimulation: tolerance and withdrawal changes. *Brain Research* 459:163-167.

Oddy WH, O'Sullivan TA (2009) Energy drinks for children and adolescents. *BMJ.* 339: b5268.

Pare W (1961) The effect of caffeine and seconal on a visual discrimination task. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 54, 506–509.

Pires VA, Pamplona FA, Pandolfo P, Prediger RD, Takahashi RN (2010) Chronic caffeine treatment during prepubertal period confers long-term cognitive benefits in adult spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Behav Brain Res.* 215(1):39-44.

Pollock GS, Vernon E, Forbes ME, Yan Q, Ma Y, Hsieh T, Robichon R, Frost DO, Johnson JE (2001) Effects of Early Visual Experience and Diurnal Rhythms on BDNF mRNA and Protein Levels in the Visual System, Hippocampus, and Cerebellum. *The Journal of Neuroscience*, 21(11):3923–3931.

Rath M (2010) Energy drinks: What is all the hype? The dangers of energy drink consumption. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners* 24 : 70–76

Rhoads DE, Huggler AL, Rhoads LJ (2011) Acute and adaptive motor responses to caffeine in adolescent and adult rats. *Pharm, Biochem and Behav* 99:81–86.

Ritchie K, Carriere I, de Mendonca A, Portet F, Dartigues JF, Rouaud O, Barberger-Gateau P, Ancelin ML (2007) The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology* 69: 536–545.

Robertson D, Wade D, Workman R, Woosley RL, Oates JA (1981) Tolerance to the humoral and hemodynamic effects of caffeine in man. *J Clin Invest.* 67(4):1111-1117.

Rossato J, Belvilaqua LRM, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M (2009) Dopamine controls persistence of Long-Term memory storage. *Science* 325: 1017-20.

Roussinov KS, Yonkov DI (1976) Cholinergic mechanisms in the learning and memory facilitating effect of caffeine *Acta Physiol. Pharmacol. Bulgarica*, 2, 61–68.

Rogers PJ, Martin J, Smith C, Heatherley SV, Smit HJ (2003) Absence of reinforcing, mood and psychomotor performance effects of caffeine in habitual non-consumers of caffeine. *Psychopharmacology (Berl)* 167: 54–62.

Rogers PJ, Heatherley SV, Mullings EL, Smith JE (2012) Faster but not smarter: effects of caffeine and caffeine withdrawal on alertness and performance. *Psychopharmacology (Berl)* [Epub ahead of print]

Sallaberry C, Nunes F, Costa, MS, Fioreze GT, Ardais AP, Botton, PH, Klaudat B, Forte T, Souza DO, Elisabetsky E, Porciúncula LO (2013) Chronic caffeine prevents changes in inhibitory avoidance memory and hippocampal BDNF immunocontent in middle-aged rats. *Neuropharmacology* 64 :153e159.

Sebastiao AM, Ribeiro JA (2009) Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* 193: 471e534.

Scherer EB, da Cunha MJ, Matté C, Schmitz F, Netto CA, Wyse AT (2010) Methylphenidate affects memory, brain-derived neurotrophic factor immunocontent and brain acetylcholinesterase activity in the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 94(2):247-53.

Sigmon SC, Herring RI, Better W, Cadet JL, Griffiths RR (2009) Caffeine withdrawal, acute effects, tolerance, and absence of net beneficial effects of chronic administration: cerebral blood flow velocity, quantitative EEG, and subjective effects. *Psychopharmacology* 204: 573–585.

Song Z, Jenson A, Squire LR (2011) Medial temporal lobe function and recognition memory: A novel approach to separating the contribution of recollection and familiarity. *J Neurosci* 31: 16026–16032.

Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S (2008) New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev.*59(1):201-20

Vila-luna S, Cabrera-isidoro S, Vila-luna I, Juárez-díaz, I, Bata-garcía LJ, Alvarez-cervera FJ, Zapata-vázquez ER, Dearankowsky-sandoval G, Heredia-lópez F, Flores G, Andgóngora-alfaro JL (2012) Chronic caffeine consumption prevents cognitive decline From young to middle age in rats, and is associated With increased length, branching, and spine density of basal dendrites in ca1 hippocampal neurons. *Neurosci.* 202: 384–395.

Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* 8: 1069e1077.

Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, Lu B, Hempstead BL (2009) Neuronal release of proBDNF. *Nat. Neurosci.* 12:113e115.

Yoshii A, Constantine-Paton M (2010) Postsynaptic BDNF-TrkB Signaling in Synapse Maturation, Plasticity, and Disease. *Develop. Neurobiology.* 70: 304-322.

## LEGENDS

### Figure 1

Analysis of locomotor and exploratory activities in the open field arena. Animals were exposed to open field arena and recorded during 10 minutes. Caffeine treatment started during adolescence period and lasted up to adulthood (50 days of administration in the drinking water).

(A) – Time spent exploring both objects in seconds (s) for caffeine (0.3 and 1 mg/mL) continuously administrated and after 24 h of withdrawal.

(B) - Time spent exploring both objects in seconds (s) for caffeine (0.3 and 1 mg/mL) continuously administrated and after 48 h of withdrawal.

(C) - Number of rearings for caffeine (0.3 and 1 mg/mL) continuously administrated and after 24 h of withdrawal.

(D) - Number of rearings for caffeine (0.3 and 1 mg/mL) continuously administrated and after 48 h of withdrawal. The data are represented as means + S.E.M. (n = 16-30 animals per group). No significant differences were found between groups using a two-way ANOVA.

### Figure 2

Analysis of caffeine continuously administered and withdrawal on the performance of object recognition task.

(A) – Recognition index for animals treated with water or caffeine continuously administered, or after 24 h of withdrawal.

(B) – Recognition index for animals treated with water or caffeine continuously administered, or after 48 h of withdrawal.



Data are displayed as means + S.E.M. (n = 16- 30 animals per group). Comparison between test and training session by using two-way ANOVA with repeated measures revealed only difference between trials.

### Figure 3

Immunoblotting analysis for BDNF (A), proBDNF (B) and TrkB (C) immunocontent in whole hippocampus from rats treated with water (black bar) or caffeine (0.3 and 1 mg/mL) continuously administered (grey bars) or after 24 or 48 of withdrawal (white bars). With representative bands.

(A) – immunoblotting for BDNF (n = 9-10). # $P < 0.05$ ; different from all groups (One-way ANOVA, Newman-Keuls multiple comparison test).

(B) – immunoblotting for proBDNF (n = 9-11). No significant differences were found between groups. (One-way ANOVA).

(C) – immunoblotting for TrkB (n = 9-10) - No significant differences were found between groups. (One-way ANOVA).

### Figure 4.

Immunoblotting analysis for BDNF (A), proBDNF (B) and TrkB (C) immunocontent in whole cerebral cortex from rats treated with water (black bar) or caffeine (0.3 and 1 mg/mL) continuously administered (grey bars) or after 24 or 48 of withdrawal (white bars).

(A) – immunoblotting for BDNF (n = 4-7). \* $P < 0.05$ ; different from water group (one-way ANOVA, Newman-Keuls multiple comparison test).

(B) – immunoblotting for proBDNF (n = 4-7). \* $P < 0.05$ ; different from water-treated rats (black bar) - (One-way ANOVA, Newman-Keuls multiple comparison test).

(C) – immunoblotting for TrkB (n = 4-6) - \* $P < 0.05$ ; different from water-treated rats (black bar) - (One-way ANOVA, Newman-Keuls multiple comparison test).

Figure 1

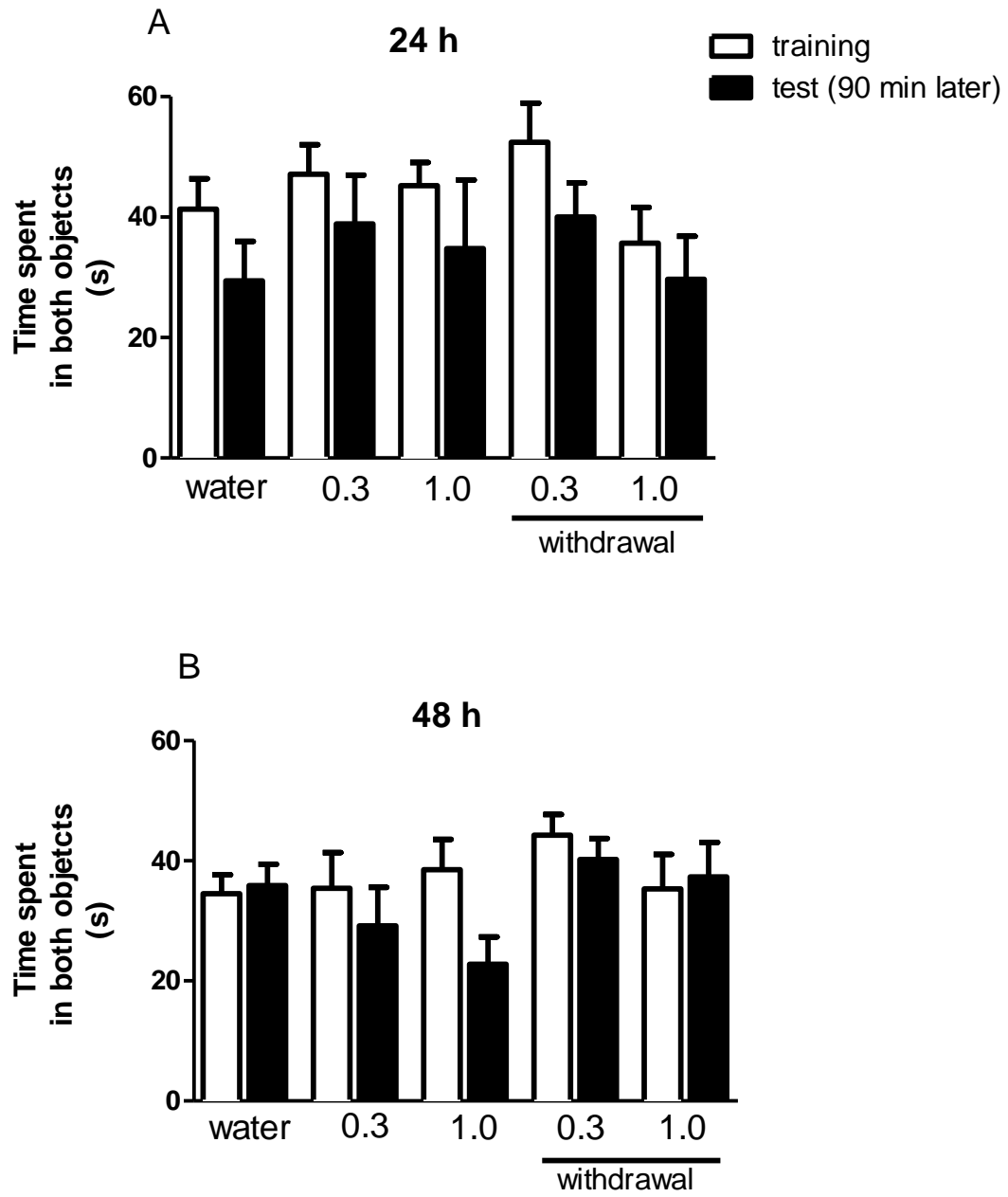


Figure 1

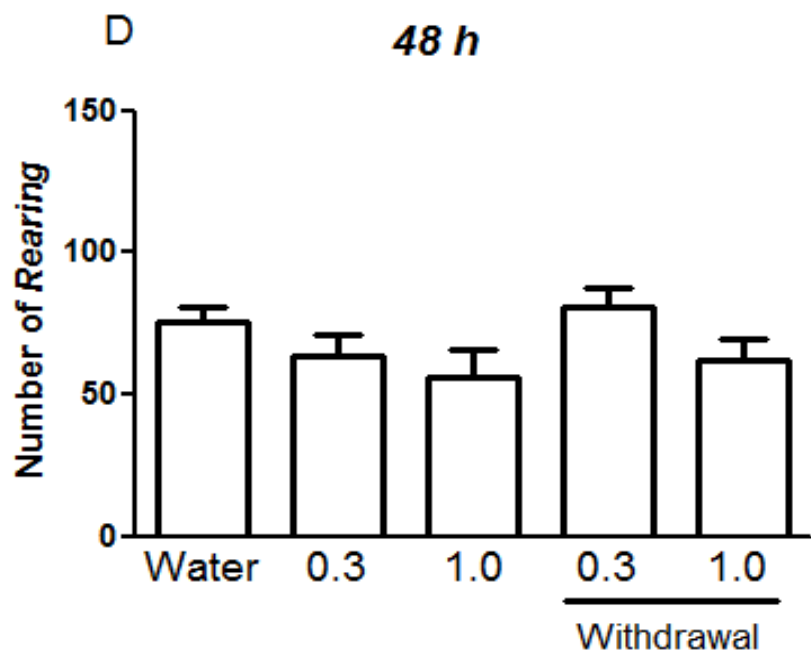
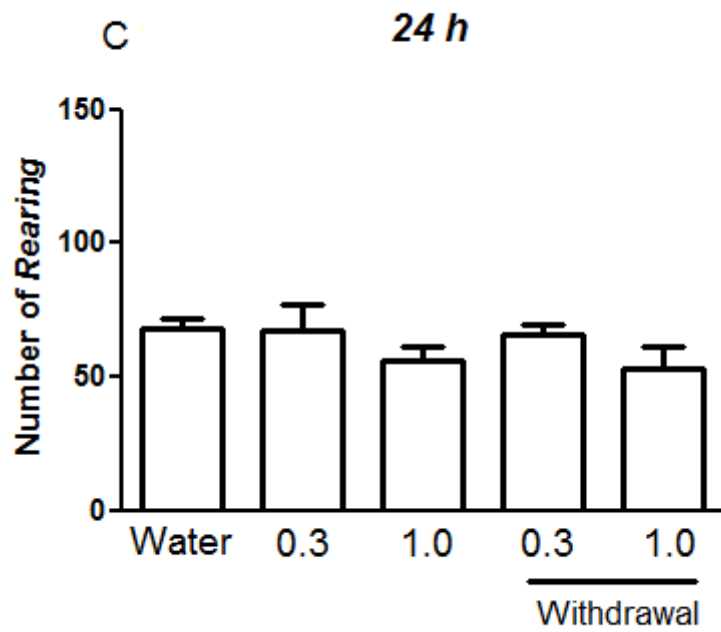
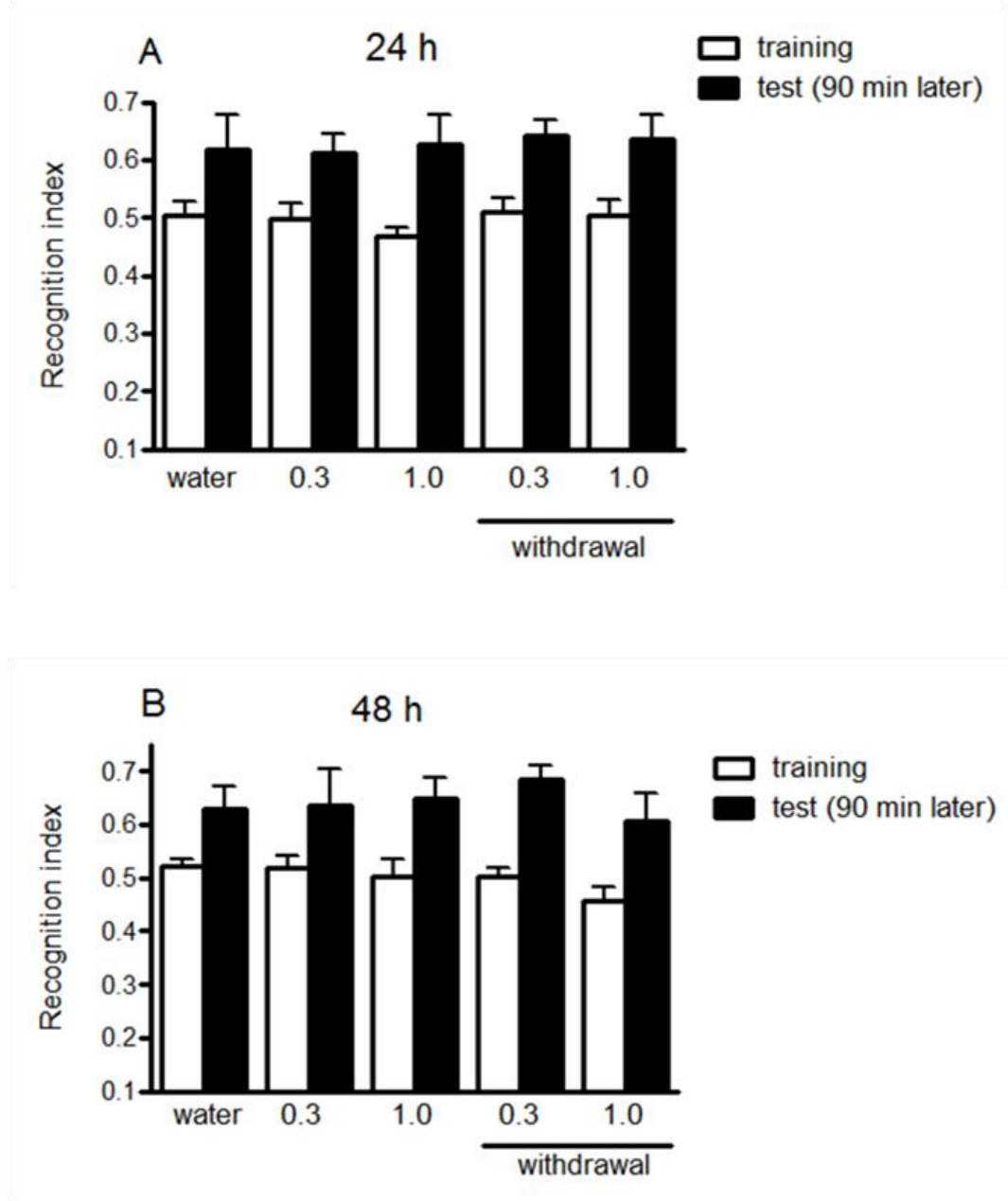


Figure 2



**Figure 3**

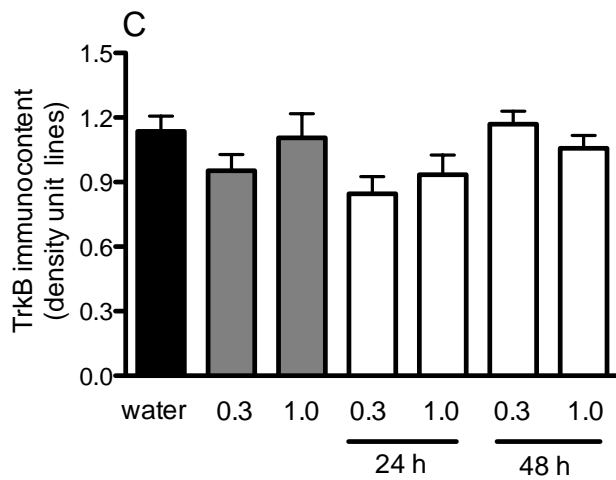
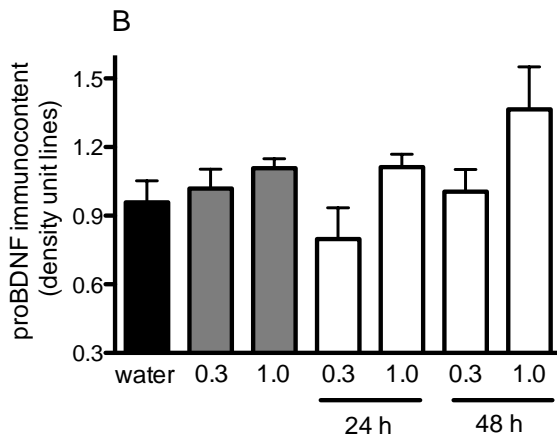
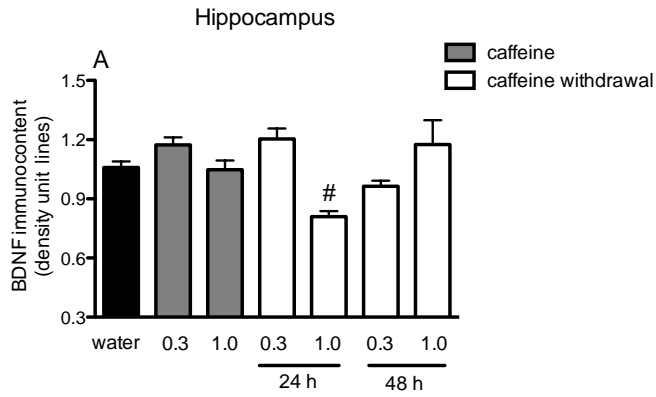
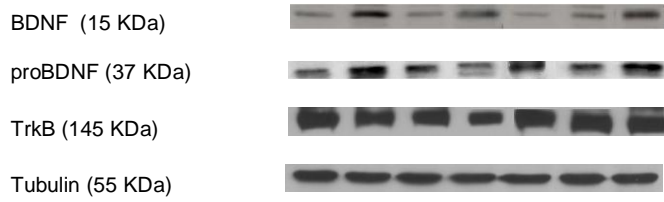
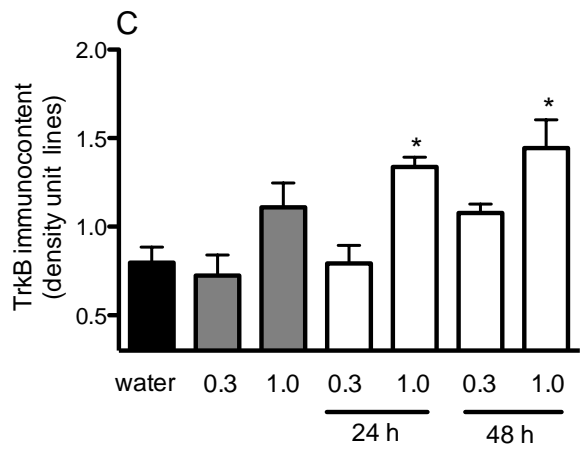
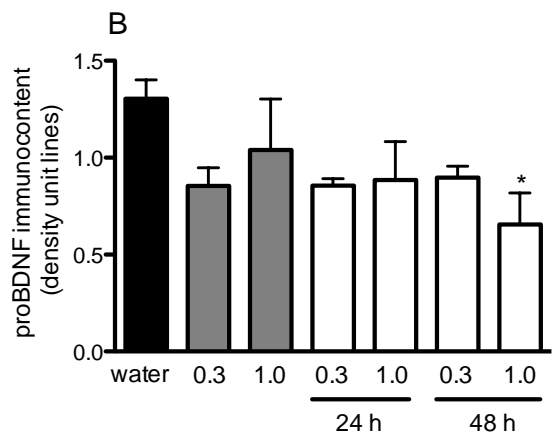
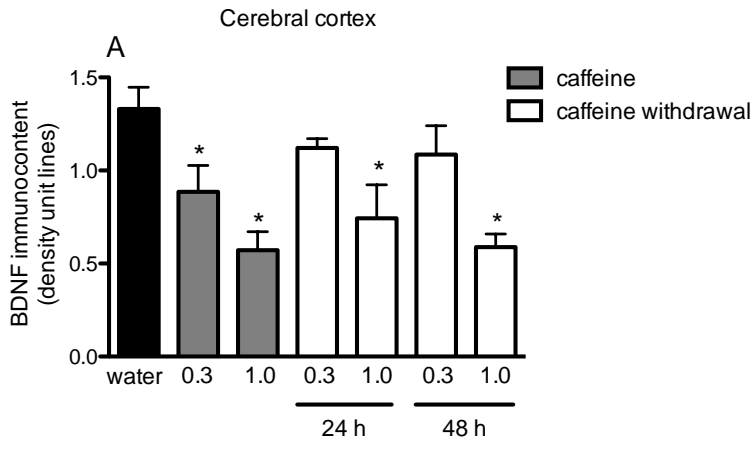
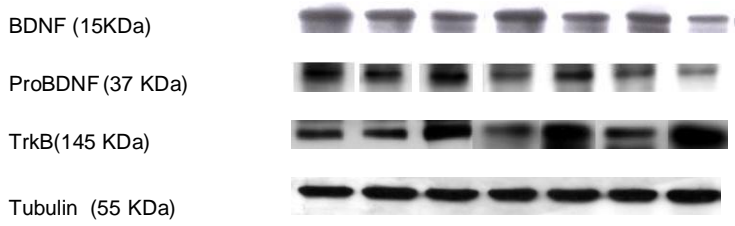


Figure 4



## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados os efeitos de uma administração crônica de cafeína e também os efeitos da retirada (abstinência) em animais que foram tratados desde a adolescência até a idade adulta, em relação à memória de reconhecimento utilizando a tarefa de reconhecimento de objetos. Além disso, o imunoconteúdo de pro-BDNF, BDNF e TrkB foram avaliados no hipocampo e no córtex. Inicialmente é importante avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais em qualquer tarefa comportamental que será posteriormente analisada, para que os efeitos sobre a memória de reconhecimento não sejam erroneamente interpretados. Tanto a administração crônica com cafeína quanto a sua retirada não alteraram a atividade locomotora e exploratória dos animais, visto que o tempo gasto em ambos os objetos e o número de elevações verticais com as duas patas traseiras (rearings) não foi modificado pelo tratamento e sua retirada. Uma das explicações pode ser o desenvolvimento de tolerância à cafeína, uma vez que protocolos de administração crônica são utilizados como um método para obter ratos adultos tolerantes à cafeína (Hotlzmann, 1988; Rhoads, 2011). Assim, qualquer efeito da cafeína sobre a memória de reconhecimento não pôde ser relacionado a alterações na atividade locomotora. Em seres humanos, a retirada da cafeína está associada a efeitos negativos de dor de cabeça, aumento da



tensão, diminuição da vigilância, desempenho da memória e cognição prejudicados (James et al, 2005). Entretanto, este efeito negativo na cognição e na memória não foi observado no nosso estudo.

A tarefa de reconhecimento de objetos é uma tarefa não aversiva que lida com a motivação natural dos animais para explorar a novidade em um contexto familiar, um instinto inato que leva os animais a aprender sobre seu ambiente (Bevins e Besheer, 2006). Antes de interpretar os dados no que diz respeito aos efeitos sobre a memória de reconhecimento, foi importante descartar possíveis efeitos que levariam a interpretação equivocada dos resultados. Além disso, estudos da década de 80 já haviam demonstrado que os animais submetidos a retirada abrupta do tratamento com cafeína apresentam diminuição da atividade locomotora (Finn e Holtzmann, 1986; Griffins e Woodson, 1988; Nehlig e Debry, 1994) e aumento do tempo de imobilidade em tarefas que avaliaram a memória espacial (Khalig et al, 2012). Embora a cafeína administrada de forma aguda possa alterar a locomoção (El Yacoubi et al, 2000), bem como a retirada (Finn e Holtzman, 1986; 1987), isto não parece ser o caso, uma vez que todos os animais exibiram o mesmo perfil exploratório e a atividade locomotora é equivalente entre os diferentes grupos, independente do tratamento. Da mesma forma, é também improvável que os presentes achados fossem confundidos com os efeitos ansiogênicos da cafeína (El Yacoubi et al, 2000; Gulick e Gould, 2009), porque a tarefa em questão foi especificamente escolhida para minimizar o estresse e ratos tratados com cafeína não apresentaram diferenças significativas em relação aos controles no que diz respeito à atividade locomotora. Neste estudo, a memória de reconhecimento que foi avaliada na idade adulta em ratos adolescentes que receberam doses moderadas à altas de cafeína permaneceu inalterada. Isso pode ser observado nos índices de reconhecimento de objetos que foram todos similares entre os grupos. As diferenças foram encontradas

somente entre as sessões de treino e teste, o que implica no reconhecimento do objeto novo na sessão de teste. Da mesma forma, não foram encontrados comprometimentos no desempenho dos animais após o período de abstinência do tratamento crônico com cafeína. Sendo assim, os resultados revelam que a abstinência de um tratamento crônico com cafeína não influenciou a memória de reconhecimento.

Em estudos com humanos a abstinência da cafeína afeta o humor e o tempo de resposta em tarefa que mede o número de erros, mas a atenção seletiva e a memória não parecem ser significativamente afetadas (Addicott e Laurienti, 2009). Devido a esses sintomas de abstinência, muitos autores questionam e apontam controvérsias sobre o efeito benéfico da cafeína e a dose necessária para esses efeitos positivos sobre as funções cognitivas (Smith e Rogers, 2011; Rogers et al., 2012).

Os dados sobre a ausência de alterações por retirada do tratamento sobre a memória de reconhecimento são novos na literatura e, como já mencionados anteriormente, esses efeitos poderiam ser atribuídos ao desenvolvimento de tolerância. De fato, dados prévios da literatura demonstraram que em um tratamento crônico, onde a cafeína é administrada na água de beber (exatamente como no nosso estudo), pode ser utilizado como um método para obter ratos adultos tolerantes a cafeína (Hotlmann, 1988; Rhoads, 2011). Nosso protocolo de administração possui algumas particularidades em relação a maioria dos estudos, pois a administração da cafeína utilizada neste trabalho foi realizada durante o ciclo ativo dos animais e retirada nos finais de semana. Isso foi feito intencionalmente a fim de mimetizar o consumo humano, evitando dessa maneira possíveis perturbações no ritmo circadiano dos animais. Apesar de ser difícil avaliar em modelos animais os sintomas de abstinência

apresentados por humanos, a vantagem dos estudos com roedores consiste em controlar melhor o protocolo de administração de cafeína.

A observação de que não houve melhora no desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos reforça resultados anteriores, os quais sugerem que melhoras evidentes em tarefas desse tipo parecem ser restritas a tratamentos agudos ao invés de administrações crônicas de cafeína (Angelucci et al, 1999; Botton et al, 2010; Costa et al, 2008a, Sallaberry et al, 2013). No contexto do presente estudo, a administração de cafeína que começou durante a adolescência, e permaneceu até a idade adulta dos animais, não causou qualquer efeito sobre a memória de reconhecimento. Esse achado é particularmente interessante tendo em vista que ratos adolescentes tratados com cafeína (3 mg/kg) apenas durante a adolescência, demonstraram um prejuízo na memória de reconhecimento durante a idade adulta (Pires et al., 2010). Analisando os resultados dos trabalhos acima mencionados conjuntamente com os nossos achados pode-se sugerir que a administração contínua de cafeína é capaz de produzir um efeito compensatório a nível cerebral que compensa essa diminuição no desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos observado durante o período de adolescência.

O BDNF é amplamente expresso no hipocampo maduro e no córtex cerebral (Pollock et al., 2001) e alterações no imunoconteúdo do BDNF e nas proteínas relacionadas a sua sinalização podem ajudar a explicar os efeitos da cafeína. Para avaliar essa neurotrofina, o seu imunoconteúdo foi quantificado no hipocampo e no córtex cerebral. Inicialmente as maiores alterações no BDNF e proteínas relacionadas foram encontrados no córtex e não do hipocampo. O imunoconteúdo de BDNF foi diminuído no hipocampo apenas na dose mais elevada de cafeína e 24 h após sua retirada. Estudos anteriores mostraram que a cafeína reverte prejuízos na memória de

reconhecimento decorrentes da idade conjuntamente com no aumento do imunocontéudo de BDNF no hipocampo (Costa et al., 2008a, Sallaberry et al., 2013). Esses dados sugerem que a diminuição do BDNF no hipocampo causada pela cafeína pode contribuir para o seus efeitos benéficos ou mesmo a ausência de efeitos sobre a memória de reconhecimento, que no nosso estudo permaneceu inalterada. De fato, em todos os estudos em que a cafeína diminuiu o BDNF no hipocampo foi observado ou nenhum efeito prejudicial foi observado na memória de reconhecimento ou houve efeito preventivo contra os prejuízos decorrentes da idade. Este efeito diferencial entre memória e BDNF parece estar restrito à cafeína, uma vez que outros psicoestimulantes também diminuíram a expressão e os níveis de BDNF, mas eles geralmente prejudicaram a memória, pelo menos em animais adolescentes (Banerjee et al, 2009; Scherer et al, 2010). 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).

O giro denteado e córtex perirrinal são fundamentais no processo que envolve a memória de reconhecimento, particularmente o córtex perirrinal está criticamente envolvido na discriminação de familiaridade enquanto que o hipocampo parece estar mais associado a memória contextual, podendo não ser necessário para a discriminação de familiaridade (Balderas et al., 2008.; Gaskin et al., 2011;. Song et al., 2011). Dada à dificuldade em dissecar perfeitamente o córtex perirrinal, o imunocontéudo de BDNF e proteínas relacionadas foram detectados em córtex cerebral inteiro. A cafeína, em ambas as doses, foi capaz de diminuir o imunocontéudo de BDNF cortical e este efeito persistiu após a retirada do tratamento na dose mais elevada, um efeito de certa forma semelhante ao encontrado no hipocampo. Diferentemente do hipocampo, o

imunoconteúdo cortical do proBDNF nos animais tratados com cafeína apresentou uma tendência a diminuir, o que pode explicar a diminuição observada nos níveis do BDNF ao longo do tempo, mesmo que apenas o grupo em abstinência por 48h foi estatisticamente significativo. 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). A diminuição do imunoconteúdo do proBDNF e do BDNF pode ser resultado de uma diminuição total dessa conversão, além disso pode 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 pode estar sendo regulado tanto ao nível da tradução como da transcrição. Alternativamente, essas mudanças na conversão de proBDNF acarretam numa diminuição do BDNF (Alonso et al., 2002; Pollock et al., 2001).

Essas modificações envolvendo BDNF maduro e proBDNF ajudam a explicar os efeitos da cafeína. A cafeína diminuiu o imunoconteúdo do proBDNF e isto pode ser considerado como um mecanismo de regulação negativa para a plasticidade cerebral, uma vez que aumenta a depressão a longo prazo (LTD) através p75NTR e leva a apoptose (Barnes e Thomas, 2008,. Lee et al, 2001; Rosch et al ., 2005; Woo et al, 2005). Além disso, o BDNF maduro se liga ao receptor de TrkB e facilita os efeitos de sobrevivência, induz e é suficiente para a potenciação de longo prazo (LTP) (Chen et al, 1999;. 2010; Figurov et al, 1996;. Kang et al, 1997.; Pang et al., 2004).

Considerando que o BDNF pode estar envolvido nos efeitos pró-cognitivos da cafeína é importante verificar se há alterações no seu receptor de alta afinidade, TrkB. Neste estudo nós observamos que embora a administração crônica de cafeína tenha diminuído os níveis de BDNF cortical, um aumento dos receptores TrkB foi observada após a retirada e uma tendência para o aumento foi observado na administração contínua na dose mais elevada. Receptores TrkB geralmente são internalizados e rapidamente degradados seguidos por uma ativação do BDNF (Silhol et al.,2008). 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). 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. 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). Evidenciando os estudos acima, neste trabalho nós observamos um aumento no imunoc conteúdo deste receptor juntamente com uma diminuição significativa dos níveis de BDNF. Pode-se sugerir que o aumento no imunoc conteúdo do receptor TrkB pode estar envolvido na ausência de efeitos da abstinência de cafeína sobre a memória de reconhecimento, considerando que tecnicamente, esse aumento do TrkB facilitaria o reconhecimento pelo anticorpo e, possivelmente, pelo ligante endógeno (Silhol et al, 2008.; Tapia-

Arancibia et al., 2008). As alterações marcantes observadas no córtex total também podem ser resultantes de uma participação ativa do córtex perirrinal durante a sessão de teste na tarefa de reconhecimento de objetos.

A sinalização operada pelo BDNF é essencial para a formação de muitos tipos de memória (Alonso et al., 2002;. Bekinschtein et al., 2007;. Choi et al., 2010; Mizuno et al., 2003). Mais recentemente, estudos têm demonstrado que o bloqueio na sinalização BDNF piora o desempenho na memória de reconhecimento (Callaghan e Kelly, 2012;. Seoane et al, 2011). Em nosso estudo, as modificações encontradas nos níveis de BDNF e nas proteínas relacionadas sugerem que a retirada da cafeína é capaz de causar mudanças adaptativas no cérebro sem prejudicar a memória de reconhecimento. Se o tratamento crônico com cafeína somente durante o período de adolescência foi capaz de prejudicar a memória de reconhecimento (Pires et al., 2010) este efeito ainda não foi detectado em nosso protocolo de administração contínua. Nossos dados também demonstram que pelo menos para a memória de reconhecimento, os efeitos benéficos da cafeína não podem ser atribuídos ao fenômeno de abstinência (retirada do tratamento) uma vez que o tratamento crônico seguido ou não de retirada não foi capaz de interferir na memória de reconhecimento.

## 6. CONCLUSÃO

O consumo de cafeína tornou-se popular em adolescentes devido ao aumento da ingestão de bebidas comercializadas como forma de bebidas energéticas. Alguns estudos consideram que os efeitos benéficos da cafeína são atribuídos a uma reversão dos sintomas de abstinência. A partir desse estudo, foi possível observar que a administração crônica com cafeína e sua retirada não afetaram a memória de reconhecimento. Esses dados facilitam estudos posteriores onde a retirada de cafeína pode ser uma fator de confusão para a interpretação dos resultados. Entretanto, mesmo sem alterações na memória de reconhecimento, as manipulações no tratamento com cafeína alteraram o BDNF e proteínas relacionadas a sua sinalização, o que implica que a plasticidade sináptica a nível molecular foi modificada. Finalmente não podemos descartar que outros tipos de memória não poderiam ser afetados por essas manipulações no tratamento, pois outras tarefas de memória não foram avaliadas. De qualquer maneira, nosso estudo revelou que a memória de reconhecimento avaliada na vida adulta não é prejudicada pelo consumo moderado a alto de cafeína, em um esquema de administração que mimetizou o consumo humano.



Referências:

Addicott MA e Laurienti PJ. (2009). A comparison of the effects of caffeine following abstinence and normal caffeine use. *Psychopharmacology* 207:423–431

Aguiar LMV, Nobre Jr. VH, Macêdo DS, Oliveira AA, Freitas RM, Vasconcelos SM, Cunha GMA, Sousa FCF, Viana GSB. (2006). Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 84:415–419.

Alonso M, Vianna MR, Depino AM, Mello e Souza T, Pereira P, Szapiro G, Viola H, Pitossi F, Izquierdo I, Medina JH. (2002). BDNF-Triggered Events in the Rat Hippocampus Are Required for Both Short- and Long-Term Memory Formation. *Hippocampus*. 12, 551-560.

Alonso M, Bekinschtein P, Camarota M, Vianna MR., Izquierdo I, Medina JH. (2005). Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn. Mem.* 12: 504-510

American Psychiatric Association. (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th edn. American Psychiatric Association, Washington

Angelucci ME, Vital MA, Cesário C, Zadusky CR, Rosalen PL, Da Cunha C. (1999). The effect of caffeine in animal models of learning and memory. *Euro. J. Pharmacol.* 373, 135–140.

Angelucci ME, Cesário C, Hiroi RH, Rosalen PL, Da Cunha C. (2002). Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 1201–1208.

Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia C, Cracchiolo JR, Shippy, D, Tan J. (2006). Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain  $\beta$ -amyloid production. *Neurosci.* 142: 941–952.

Assaife-Lopes N, Sousa VC, Pereira DB, Ribeiro JA, Chao MV, Sebastião AM. (2010). Activation of adenosine  $A_{2A}$  receptors induces TrkB translocation and increases BDNF-mediated phospho-TrkB localization in lipid rafts: implications for neuromodulation. *J. Neurosci.* 30, 8468-8480.

Barboza IG. (2009) 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.

Barone JJ, Roberts HR. (1996). Caffeine consumption. *Food Chem Toxicol* 34: 119-129.

Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. (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, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105, 2711-2716.

Benowitz NL, Jacob P 3rd, Mayan H, Denaro C. (1995). Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans. *Clin Pharmacol Ther* 58, 684-691.

Bevins RA, Besheer J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc.* 1(3):1306-11.

Botton PH, Costa MS, Ardais AP, Mioranza S, Souza DO, da Rocha JB, Porciúncula LO. (2010). 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.

Bernstein GA, Carroll ME, Thuras PD et al .(2002). Caffeine dependence in teenagers. *Drug Alcohol Depend* 66:1 6

Chen JF. Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH,Beilstein M, Sonsalla PK, Castagnoli K, Castagnoli Jr N, Schwarzschild MA. (2001). Neuroprotection by Caffeine and A2A Adenosine Receptor Inactivation in a Model of Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience.* 21: RC143 1 of 6.

Chen JF, Yu L, Shen HY, He JC, Wang X, Zheng R. (2010). What knock-out animals tell us about the effects of caffeine. *J Alzheimers Dis.* 20(1):S17-24.

Chou T. (1992). Wake up and smell the coffee. Caffeine, coffee, and the medical consequences. *West J Med* 157, 544-553.

Clauson KA, Shields KM, McQueen CE, Persad N.(2008). Safety issues associated with commercially available energy drinks. *J Am Pharm Assoc (Wash DC).* 48(3):e55–e63; quiz e64–e67.

Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Souza DO, Porciúncula LO. (2008a). 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.

Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Ardais AP, Moreira JD, Souza DO, Porciúncula LO. (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.

Cunha RA. (2001). 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.

Cunha RA. (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 OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. (2007). Caffeine and adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists prevent beta amyloid (25-35) induced cognitive deficits in mice. *Exp. Neurol.* 203,241-245.

Daly JW, Fredholm BB. (1998). Caffeine an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend* 51:199-206

Daly JW, Shi D, Nikodijevic O, Jacobson KA. (1999). The role of adenosine receptors in the central action of caffeine. In: Gupta BS, Gupta U (eds) *Caffeine and behavior-current views and research trends*. CRC, Boca Raton, pp 1-16

Diogenes MJ, Fernandes CC, Sebastiao AM, Ribeiro JA. (2004). Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 24, 2905-2913.

Denaro CP, Brown CR, Wilson M, Jacob P 3rd, Benowitz NL. (1990). Dose-dependency of caffeine metabolism with repeated dosing. *Clin Pharmacol Ther* 48, 277-285.

Dews PW. (1982) Caffeine . *Ann. Rev. Nutr.* 2: 323-41.

Dreumont-Boudreau SE, Dingle RN, Alcolado GM, Lolordo VM. (2008). Conditioned flavor avoidance as a measure of withdrawal in rats chronically exposed to a caffeine solution. *Physiol.Behav.* Sep 3;95(1-2):245-51

Elgklou L. (1993). *Kaffeboken*. Wiken, Sverige.

Espinosa J, Rocha A, Nunes F, Costa MS, Schein V, Kazlauckas V, Kalinine E, Souza DO, Cunha RA, Porciúncula LO. (2013). Caffeine Consumption Prevents Memory Impairment, Neuronal Damage, and Adenosine A2A Receptors Upregulation in the Hippocampus of a Rat Model of Sporadic Dementia. *J Alzheimers Dis.* 1;34(2):509-18.

Eskelinen MH, 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. *JAD* 16: 85e91.

Fedele DE, Li T, Lan JQ, Fredholm BB, Boison D. (2006). Adenosine A1 receptors are crucial in keeping an epileptic focus localized. *Exp Neurol.* Jul;200(1):184-90.

Finn IB e Holtzman SG. (1986). Tolerance to caffeine-induced stimulation of locomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 238:542–546.

Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51, 83-133.

Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53: 527–552.

Fredholm BB, Cunha R, Svenningsson P. (2003). Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 413-426

Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM. (2005). Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol.* 63: 191–270.

Gilliland K, Bullock W. (1984). Caffeine: a potential drug of abuse. *Adv Alcohol Subst Abuse* 3:53-73

Goldstein A. (1964). Wakefulness caused by caffeine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 248:269-78

Goldstein A, Kaizer S, Whitby O. (1969). Psychotropic effects of caffeine in man. IV. Quantitative and qualitative differences associated with habituation to coffee. *Clin Pharmacol Ther* 10:489–497

Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J. Neurosci.* 29, 12764-12767.



Griffiths RR e Woodson PP. (1988). Caffeine physical dependence: A review of human and laboratory animal studies. *Psychopharmacology* 94:437–451.

Gulick D e Gould T. (2009). Effects of ethanol and caffeine on behavior in C57BL/6 mice in the plus-maze discriminative avoidance task. *Behav Neurosci.* 123(6): 1271–1278.

Gyárfás T, Knuutila J, Lindholm P, Rantama`ki T, Castrén E. (2010). Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF) by Anti-Parkinsonian Drug Therapy In Vivo. *Cell Mol Neurobiol.* 30:361–368

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

Joghataie M, Roghani M, Negahdar F, Hashemi L. (2004). Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. *Parkinsonism and Related Disorders.* 10: 465–468

Juliano LM e Griffiths RR. (2004). A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. *Psychopharmacology* 176:1–29.

Kaplan GB, Greenblatt DJ, LeducBW, Thompson ML, Shader RI .(1989). Relationship of plasma and brain concentrations of caffeine and metabolites to benzodiazepine receptorbinding and locomotor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 248,1078-1083.

Khalig S, Haider S, Nagyi F, Perveen T, Saleem S, Haleem DJ. (2012). Altered brain serotonergic neurotransmission following caffeine withdrawal produces behavioral deficits in rats *Pak. J.Pharm Sci. Jan;25(1):21-5*

Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. (1990). The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65, 189-197.

Kopf SR, 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.

Lamballe F, Klein R, Barbacid M. (1991). *TrkC*, a new member of the *Trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967–979.

Latini S, Pedata F. (2001).Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Journal of Neurochemistry.* 79: 463-484

Lee FS, Chao MV. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 3555–3560, 2001.

Lelo A, Birkett DJ, Robson RA, Miners JO. (1986). Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. *Br J Clin Pharmacol* 22, 177-182.

Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. (1993). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341-374.

Linnarsson S, Björklund A, Ernfors P. (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci.* 9(12):2581-7.

Lu B, Chow A. (1999). Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. *J. Neurosci. Res.* 58: 76-87.

Maia L, de Mendonca A. (2002) Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur. J. Neurol.* 9:377e382.

Martín I, López Vílchez MA, Mur A et al. (2007). Neonatal withdrawal syndrome after chronic maternal drinking of mate. *Ther Drug Monit* 29:127-129

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. (2001). Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 63: 71-124.

McGowan JD, Altman RE, Kanto WP. (1988). Neonatal withdrawal symptoms after chronic maternal ingestion of caffeine. *South Med J* 81:1092-1094

Nairon AF (1617). Referred to in Weinberg BA, Bealer BK (eds) *De Saluberrimá Cabue seu Café nuncupata Discoursus*. *The World of Caffeine*. Routledge, New York, 2001.

Nehlig A, Daval JL, Debry G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev* 17:139-170

Nehlig A e Debry G. (1994). Effects of coffee on the central nervous system, in *Coffee and Health* (Debry G ed) pp 157-249, John Libbey, Montrouge.

Nehlig A. (1999). Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neurosci Biobehav Rev* 23:563-576

Pereira GS, Mello & Souza T, Vinade ERC, Choi H, Rodrigues C, Battastini AMO, Izquierdo I, Sarkis JJF, Bonan CD. (2002). Blockade of adenosine A1 receptors in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 437, 151-154.

Pereira GS, Rossato JI, Sarkis JJF, Cammarota M, Bonan CD, Izquierdo I. (2005). Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex impairs memory retrieval in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory* 83, 217–223.

Pollock GS, Vernon E, Forbes ME, Yan Q, Ma YT, Hsieh T, Robichon R, Frost DO. (2001). 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.

Prediger RD, Takahashi RN. (2005a). Modulation of short term social memory in rats by adenosine A1 and A(2A) receptors. *Neurosci Lett*, 376:160-165.

Prediger RD, Batista LC, Takahashi RN. (2005b). 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.

Rath M. (2010). Energy drinks: What is all the hype? The dangers of energy drink consumption. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners* 24 : 70–76

Ritchie K, Carriere I, de Mendonca A, Portet F, Dartigues JF, Rouaud O, Barberger-Gateau P, Ancelin ML (2007) The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology* 69:536–545.

Rogers PJ, Martin J, Smith C, Heatherley SV, Smit HJ. (2003). Absence of reinforcing, mood and psychomotor performance effects of caffeine in habitual non-consumers of caffeine. *Psychopharmacology* 167:54–62

Rogers PJ, Heatherley SV, Hayward RC, Seers HE, Hill J, Kane M. (2005). Effects of caffeine and caffeine withdrawal on mood and cognitive performance degraded by sleep restriction. *Psychopharmacology* 179:742–752.

Rogers PJ, Heatherley SV, Mullings EL, Smith JE. (2012). Faster but not smarter: effects of caffeine and caffeine withdrawal on alertness and performance. *Psychopharmacology*. DOI 10.1007/s00213-012-2889-4

Rossato, J.I., Bevilacqua, 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.

Sallaberry C, Nunes F, Costa MS, Fioreze GT, Ardais AP, Botton PH, Kludat B, Forte T, Souza DO, Elisabetsky E, Porciúncula LO. (2013). Chronic caffeine prevents changes in inhibitory avoidance memory and hippocampal BDNF immuncontent in middle-aged rats. *Neuropharmacology* 64 :153 e 159.

Sebastiao AM e Ribeiro JA. (2009). Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* 193, 471-534.

Shook BC, Rassnick S, Osborne MC, Davis S, Westover L, Boulet J, Hall D, Rupert KC, Heintzelman GR, Hansen K, Chakravarty D, Bullington JL, Russell R, Branum S, Wells KM, Damon S, Youells S, Li X, Beauchamp DA, Palmer D, Reyes M, Demarest K, Tang Y, Rhodes K, Jackson PF . (2010). In Vivo Characterization of a Dual Adenosine A2A/A1 Receptor Antagonist in Animal Models of Parkinson's Disease. *J. Med. Chem.* 53: 8104–8115

Sigmon SC, Herning RI, Better W, Cadet JL, Griffiths RJ. (2009). Caffeine withdrawal, acute effects, tolerance, and absence of net beneficial effects of chronic administration: cerebral blood flow velocity, quantitative EEG, and subjective effects. *Psychopharmacology* 204:573–585.

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.

Solinas M, Ferré S, Antoniou K, Quarta D, Justinova Z, Hockemeyer J, Pappas LA, Segal PN, Wertheim C, Muller CE, Goldberg SR. (2005). Involvement of adenosine A1 receptors in the discriminative-stimulus effects of caffeine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 179: 576–586.

Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton B R, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K, Parada LF. (1991). The neurotrophic factors brain-

derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the TrkB tyrosine kinase receptor. *Cell* 65, 895–903.

Suzuki F, Shimada J, Shiozaki S, Ichikawa S, Ishii A, Nakamura J, Nonaka H, Kobayashi H, Fuse E. (1993). 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.

Toblin RL, Clarke-Walpe K, Kok BC, Sipos ML, Reed W, Thomas JL (2012) Energy Drink Consumption and Its Association with Sleep Problems Among U.S. Service Members on a Combat Deployment — Afghanistan, 2010. *MMWR* 61 (44): 895-896.

Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. (2002). From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn. Mem.* 9, 224–237.

Ukers WH. (1922). All about coffee. The Tea and Coffee Trade Journal Company, New York

Vila-luna S, Cabrera-isidoro S, Vila-luna I, Juárez-díaz, I, Bata-garcía LJ, Alvarez-cervera FJ, Zapata-vázquez ER, Dearankowsky-sandoval G, Heredia-lópez F, Flores G, Andgóngora-alfaro JL (2012) Chronic caffeine consumption prevents cognitive decline From young to



middle age in rats, and is associated With increased length, branching, and spine density of basal dendrites in ca1 hippocampal neurons. *Neurosci.* 202: 384–395.

Vittielo MV, Woods SC. (1977). Evidence for withdrawal from caffeine by rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 6, 553—555.

Weinberg BA, Bealer BK .(2001). *The world of caffeine. The science and culture of the world's most popular drug.* Routledge, New York

Zhu W, Bijur GN, Styles NA, Li X. (2004). Regulation of FOXO3a by brain-derived neurotrophic factor in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Molecular Brain Research*.126: 45 –56.