

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**CAFEÍNA SUPRIME A MELHORA NA MEMÓRIA DE LONGA DURAÇÃO E DE  
LOCALIZAÇÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO EM RATOS DE MEIA-IDADE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**José Luiz Cechella Júnior**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

**CAFEÍNA SUPRIME A MELHORA NA MEMÓRIA DE LONGA DURAÇÃO E DE LOCALIZAÇÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO EM RATOS DE MEIA-IDADE**

**José Luiz Cechella Júnior**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Rogério Zeni**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cechella, José Luiz Jr

CAFEÍNA SUPRIME A MELHORA NA MEMÓRIA DE LONGA DURAÇÃO E DE LOCALIZAÇÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO EM RATOS DE MEIA-IDADE / CAFEÍNA SUPRIME A MELHORA NA MEMÓRIA DE LONGA DURAÇÃO E DE LOCALIZAÇÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO EM RATOS DE MEIA-IDADE / José Luiz Jr Cechella.-2014.

51 p. ; 30cm

Orientadora: Gilson Zeni

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2014

1. Cafeína 2. Memória 3. Exercício 4. Meia-idade I.  
Zeni, Gilson II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**CAFEÍNA SUPRIME A MELHORA NA MEMÓRIA DE LONGA DURAÇÃO E DE  
LOCALIZAÇÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO EM RATOS DE MEIA-IDADE**

elaborada por  
**José Luiz Cechella Júnior**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**



**Gilson R. Zeni, Dr.**  
(Presidente, Orientador)



**Leandro Rodrigo Ribeiro, Dr. (UFSM)**



**Elisângela Colpo, Dr.ª (UNIFRA)**

Santa Maria, 29 de Julho de 2014.

## **AGRADECIMENTOS**

As primeiras palavras de agradecimento vão dirigidas aos meus orientadores, Gilson e Cristina, pelo apoio de todas as formas, pelo respeito, dedicação, pela afetividade sempre presente, pela generosidade em compartilhar os seus conhecimentos, pela paciência, pelo compromisso com a minha formação e desenvolvimento, pela oportunidade e por me apresentarem um mundo ainda muito desconhecido por mim, mas muito fascinante. Serei eternamente grato a vocês, do fundo do meu coração, **MUITO OBRIGADO**.

Ao amor da minha vida e esposa, Tissiana, pelo carinho, dedicação, pela paciência e principalmente pelo incentivo aos meus (nossos) projetos de vida, Te Amo Vida.

A minha família, pelo carinho, apoio e palavras de incentivo.

A família Nogueira, Eduardo, Ester, Cacá, Melissa, Bete, Vini, Guigo, Kaia, pelo apoio, carinho e incentivo.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade, pelos ensinamentos e camaradagem.

Aos grandes amigos Cesar, Marlon e Fernando, pela grande amizade e companheirismo.

Aos amigos do Lab. GZ, pela amizade, companheirismo e camaradagem.

Aos colegas do Lab. Félix e do LABIOEX, pelo companheirismo e amizade.

À banca por avaliar este trabalho.

Ao Rinaldo, por cuidar dos animais.

A CAPES, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que ainda continuam contribuindo para o meu crescimento profissional.

Muito Obrigado!

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

### **Cafeína suprime a melhora na memória de longa duração e de localização induzida pelo exercício em ratos de meia-idade**

AUTOR: JOSÉ LUIZ CEHELLA JÚNIOR

ORIENTADOR: GILSON ROGÉRIO ZENI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de Julho de 2014

O declínio da função cognitiva está intimamente relacionado com mudanças cerebrais geradas pela idade. Estudos têm demonstrado que tanto a cafeína quanto o exercício físico previnem o dano na memória em modelos animais e em seres humanos. O objetivo do presente estudo foi investigar se o exercício de natação e a administração de cafeína melhoram a memória em ratos Wistar de meia-idade. Ratos Wistar machos (18 meses) receberam cafeína numa dose de 30 mg/kg, 5 dias por semana, por um período de 4 semanas. Os animais foram submetidos ao exercício de natação com uma sobrecarga de 3 % de peso corporal, 20 minutos por dia, durante 4 semanas. Após o treinamento, foram realizados o teste de reconhecimento do objeto (ORT) e o teste de localização do objeto (OLT). Após os testes comportamentais, os animais foram mortos por decapitação, os cérebros foram removidos e os hipocampus separados para as análises. Os resultados deste estudo demonstraram que a cafeína suprimiu o efeito do exercício na melhora da memória de longo prazo (ORT) e na memória espacial (OLT) nos animais de meia-idade, e esse efeito parece estar relacionado a uma diminuição na sinalização hipocampal da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc fosforilada (CREB). Este estudo também forneceu evidências de que os efeitos deste protocolo na memória não foram acompanhados por alterações nos níveis de proteína quinase serina/treonina (p-Akt) fosforilada. A captação de glutamato [<sup>3</sup>H] foi reduzida no hipocampo dos ratos de meia-idade que receberam cafeína e foram submetidos ao protocolo de natação. Em conclusão, a cafeína suprimiu o efeito do exercício na melhora da memória de longa duração, memória espacial, nos níveis fosforilados e ativos de CREB e Akt.

**Palavras-chave:** cafeína, memória, exercício, CREB, Akt, meia-idade

## **ABSTRACT**

Dissertation of Master's Degree  
Postgraduate Programme in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria

### **Caffeine suppresses exercise-enhanced long-term and location memory in middle-aged rats**

**AUTHOR: JOSÉ LUIZ CECHELLA JÚNIOR**

**ADVISOR: GILSON ROGÉRIO ZENI**

Date e Place of the Defense: Santa Maria, July 29, 2014

The cognitive function decline is closely related with brain changes generated by age. The ability of caffeine and exercise to prevent memory impairment has been reported in animal models and humans. The purpose of the present study was to investigate whether swimming exercise and caffeine administration enhance memory in middle-aged Wistar rats. Male Wistar Rats (18 months) received caffeine at a dose of 30 mg/kg, 5 days per week by a period of 4 weeks. Animals were subjected to swimming training with a workload (3% of body weight, 20 min per day for 4 weeks). After 4 weeks, the object recognition test (ORT) and the object location test (OLT) were performed. After behavioral tests, all animals were killed by decapitation, brains were removed and hippocampi were separated for analysis. The results of this study demonstrated that caffeine suppressed exercise-enhanced long-term (ORT) and spatial (OLT) memory in middle-aged and this effect may be related to a decrease in phosphorylated cAMP-response element-binding protein (p-CREB) hippocampal signaling. This study also provided evidence that the effects of this protocol on memory were not accompanied by alterations in the levels of phosphorylated serine/threonine protein kinase (p-Akt). The [<sup>3</sup>H] glutamate uptake was reduced in hippocampus of rats administered with caffeine and submitted to swimming protocol. In conclusion, caffeine suppressed the effect of exercise in improving long-term memory, spatial memory, the active and phosphorylated levels of Akt and CREB.

**Keywords:** caffeine, memory, exercise, CREB, Akt, middle-aged.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1.</b> Composição relativa da população residente total, por sexo e grupos de idade – Brasil – 1991/2010.....	<b>10</b>
<b>Figura 2.</b> Estruturas moleculares da cafeína e da adenosina.....	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da síntese de adenosina e seu mecanismo de ação no sistema nervoso central.....	<b>17</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

**5'NT** – 5' nucleotidase

**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>

**AC** – Adenilato ciclase

**ADK** – Adenosina quinase

**Akt** – Proteína quinase serina/treonina

**AMP** – Adenosina monofosfato

**AMPc** – Adenosina monofosfato cíclico

**ATP** – Adenosina trifosfato

**BDNF** – Fator neurotrófico derivado do cérebro

**CREB** – Proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc

**EctoN** – Ectonucleotidases

**ENT** – Transportador de nucleosídeos

**NMDA** – N-metil-D-aspartato

**PI3K** – Fosfatidilinositol 3 quinase

**SNC** – Sistema nervoso central

**TrkB** – Tirosina quinase B

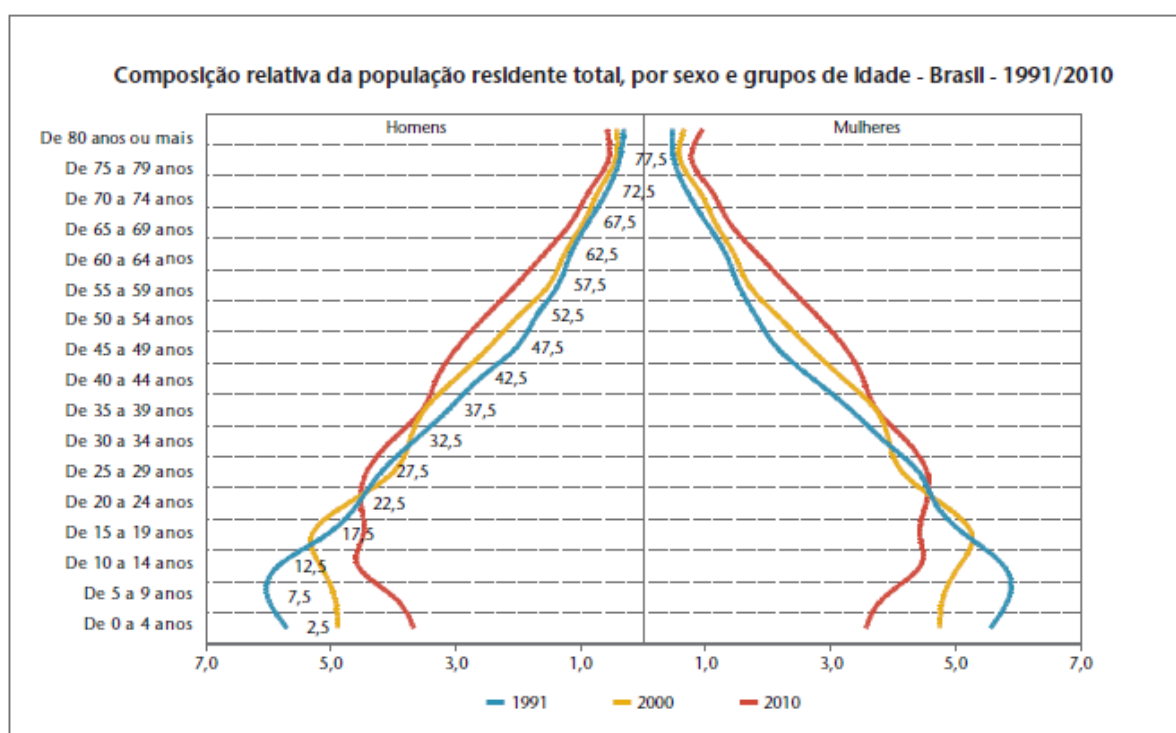
## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Envelhecimento, memória e sinalização celular.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Cafeína e receptores de adenosina.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Exercício e qualidade de vida.....</b>	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Objetivos gerais .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>3 DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Artigo Científico (Manuscrito).....</b>	<b>23</b>
Resumo .....	25
Introdução .....	26
Resultados.....	27
Discussão.....	28
Materiais e Métodos.....	32
Referências Bibliográficas .....	37
Legendas das figuras, tabelas e figuras.....	40
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Envelhecimento, memória e sinalização celular

Amparado pela maior expectativa de vida, redução nas taxas de natalidade (figura 1), melhores condições socioeconômicas atuais e os avanços da medicina no diagnóstico precoce e no tratamento de doenças antes não controláveis, aumentou-se o percentual de pessoas idosas nas sociedades em todo o mundo. O número de brasileiros acima de 65 anos deve praticamente quadruplicar até 2060, passando de 14,9 milhões (7,4% do total), em 2013, para 58,4 milhões (26,7% do total) (IBGE, 2010b).



**Figura 1.** Composição relativa da população residente total, por sexo e grupos de idade - Brasil - 1991/2010 (IBGE, 2010a).

Naturalmente, com o aumento da expectativa de vida surgem preocupações com respeito à qualidade de vida no envelhecimento, principalmente com o bem estar mental (ROSENZWEIG E BARNES, 2003). O envelhecimento é um processo dinâmico, progressivo e fisiológico, acompanhado por modificações morfológicas e funcionais, assim como

modificações bioquímicas e psicológicas (ZAMBALDI ET AL., 2007). Nesse processo, o acúmulo progressivo de danos a macromoléculas, bem como a diminuição da eficiência dos sistemas de reparo e manutenção celular é bem caracterizado (RAHMAN, 2009). O envelhecimento celular ocorre de uma deterioração geneticamente programada, o qual indica o término da capacidade das células de se dividirem, se renovarem e se regenerarem (SANTOS ET AL., 2009). Segundo (PALÁCIOS ET AL., 2004), este tipo de enfraquecimento é inevitável e definido por regras biológicas que ainda não são totalmente esclarecidas. O organismo envelhece como um todo, mas o envelhecimento é diferenciado para cada tecido, órgão, célula e o estilo de vida que é assumido ou imposto desde a infância ou adolescência influenciam neste processo de envelhecimento fisiológico (NEWSON E KEMPS, 2005). Déficits físicos, cognitivos e comportamentais observados no envelhecimento resultam de um conjunto de alterações biológicas que desencadeiam cascatas de eventos moleculares e celulares as quais geram diversos danos ao sistema nervoso central (DRACHMAN, 1997). Um dos primeiros alvos do SNC, susceptível aos danos estruturais e fisiológicos relacionados ao envelhecimento, é o hipocampo (ROSENZWEIG E BARNES, 2003, JACOBSON ET AL., 2008), em parte estes danos hipocampais são responsáveis pelo declínio da memória com o envelhecimento (DRISCOLL E SUTHERLAND, 2005).

Em relação às alterações cognitivas no processo de envelhecimento, uma das principais queixas dos idosos, tem sido em relação às dificuldades na memória (PARENTE, 2006). A memória tem sido definida como um conjunto de sistemas que permite adquirir, reter permanentemente ou temporariamente e recuperar informações e conhecimentos (CASANOVA SOTOLONGO ET AL., 2004). Os diferentes tipos de memória podem ser classificados de acordo com o tempo que duram (imediate, de curta e longa duração), e de acordo com seu conteúdo (declarativas e procedurais), existindo uma correlação entre estas

memórias e as zonas cerebrais que intervêm em sua formação e, talvez, em seu armazenamento (SQUIRE E ZOLA, 1996, IZQUIERDO E MCGAUGH, 2000, IZQUIERDO, 2011).

#### Memória imediata

Memória imediata é o tipo de memória que se mantém durante alguns segundos, no máximo alguns minutos, a informação que está sendo processada no momento; sua capacidade é limitada (aproximadamente sete itens) e as informações são mantidas por processos de atenção e ensaio. Esta espécie de memória diferencia-se das demais por não deixar traços e não produzir arquivos (IZQUIERDO, 2002).

#### Memória de curto prazo

Memória de curto prazo retém as informações durante um curto período de tempo, podendo durar minutos ou horas. Este tipo de memória deixa traços e produz arquivos os quais, em determinado momento, podem ser eliminados ou transferidos definitivamente para o sistema de memória de longo prazo.

#### Memória de longo prazo

Memória de longo prazo é ilimitada em sua capacidade, automantida e estável (dura dias, semanas, meses ou anos), permitindo a evocação de informações depois de décadas de armazenamento (BAXTER E BAXTER, 2001, ULLMAN, 2004). A memória de longo prazo é subdividida de acordo com o seu conteúdo, e fazem parte deste subsistema a memória declarativa ou explícita que é a lembrança consciente de fatos e acontecimentos, memórias adquiridas com plena intervenção da consciência. São processadas as memórias para eventos, fatos, palavras, faces, músicas, todos os conhecimentos que adquirimos durante uma vida de experiências e aprendizados, que podem potencialmente ser declarados, trazidos à mente de uma forma verbal ou como uma imagem mental (IZQUIERDO, 2002, SQUIRE E KANDEL, 2003). Este sistema está subdividido em memória episódica e memória semântica (EICHENBAUM, 1997, IZQUIERDO, 2002, SQUIRE E KANDEL, 2003). Memória episódica reúne as memórias

autobiográficas (experiências, emoções e acontecimentos específicos), referentes a eventos aos quais assistimos ou participamos (IZQUIERDO, 2002, SQUIRE E KANDEL, 2003). Memória semântica reúne as memórias para fatos, se referindo à capacidade de evocar fatos, conceitos, significados e conhecimentos gerais acerca do mundo (IZQUIERDO, 2002, SAUMIER E CHERTKOW, 2002, SQUIRE E KANDEL, 2003).

Memória procedural ou implícita são adquiridas gradualmente ao longo de diversas experiências, e está relacionada com a capacidade ou habilidade motora e sensorial (hábitos). Apresenta qualidade automática resultante da experiência, onde tarefas são desempenhadas sem que percebamos, como por exemplo, andar de bicicleta, nadar, correr (SQUIRE E KANDEL, 2003, IZQUIERDO, 2011).

O processo de formação da memória envolve algumas etapas, começando pela aquisição ou registro de um acontecimento, de um pensamento, de uma emoção (evento qualquer) nos sistemas neurais ligados a memória (SQUIRE E KANDEL, 2003). A segunda etapa consiste na codificação destes eventos que compara ou seleciona através das semelhanças e diferenças, entre memórias recentes e antigas para ser armazenado na memória (GUYTON E HALL, 1997, SQUIRE E KANDEL, 2003). Seguindo para a etapa de armazenamento ou consolidação, que é a manutenção do conhecimento, onde podem ser reforçados pela repetição ou associação com outros dados e onde ficam disponíveis para ser lembrados (GUYTON E HALL, 1997). A última etapa é conhecida como evocação ou recordação, que consiste num processo que permite a localização ou acesso a uma memória armazenada para utilizá-la mentalmente ou através do comportamento (IZQUIERDO, 2002).

Todas estas etapas envolvidas no processo de formação da memória envolvem eventos moleculares, que ocorrem em estruturas diferentes no sistema nervoso central (WYSE ET AL., 2004). Alterações na liberação de neurotransmissores pelos neurônios, bem como a eficiência na comunicação entre tais neurônios no hipocampo, córtex cerebral e outras estruturas

encefálicas, parecem ser eventos neuroquímicos primários para a formação da memória (IZQUIERDO E MCGAUGH, 2000, MCGAUGH, 2002). De fato, estudos com roedores (EICHENBAUM H. ET AL., 2002) e com primatas (BRASTED ET AL., 2003), revelam que o aumento na liberação de neurotransmissores, principalmente o glutamato, corresponde ao primeiro passo para a formação da memória (MCGAUGH, 2000, MCGAUGH E IZQUIERDO, 2000). Além disso, todos os processos de formação de memória e sinalização celular estão sujeitos à modulação, inclusive por outros neurotransmissores diferentes do glutamato que são liberados por neurônios presentes na própria estrutura ou em estruturas adjacentes (IZQUIERDO, 1993, CAHILL E MCGAUGH, 1998, MCGAUGH, 2002), como a ativação dos receptores de tirosina quinase B (TrkB), que modulam a diferenciação e sobrevivência neuronal e a plasticidade sináptica por meio de múltiplas vias de sinalização. Como por exemplo, através da ativação das vias da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)/proteína quinase serina/treonina (Akt) e da proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc (CREB), que são essenciais para a formação da memória e o aprendizado (OHIRA E HAYASHI, 2009, SAKAMOTO ET AL., 2011). A integridade da sinalização para a ativação dos receptores de TrkB é afetada pelo envelhecimento, sendo correlacionada com déficits de memória em roedores velhos (KRAMER ET AL., 2006, VON BOHLEN E HALBACH, 2010).

Dada a escassez de medidas terapêuticas efetivas para o declínio na memória com o envelhecimento e em diversas doenças neurodegenerativas, uma importante tendência de investigação científica é a pesquisa de novos compostos com propriedades neuroprotetoras .

## **1.2 Cafeína e receptores de adenosina**

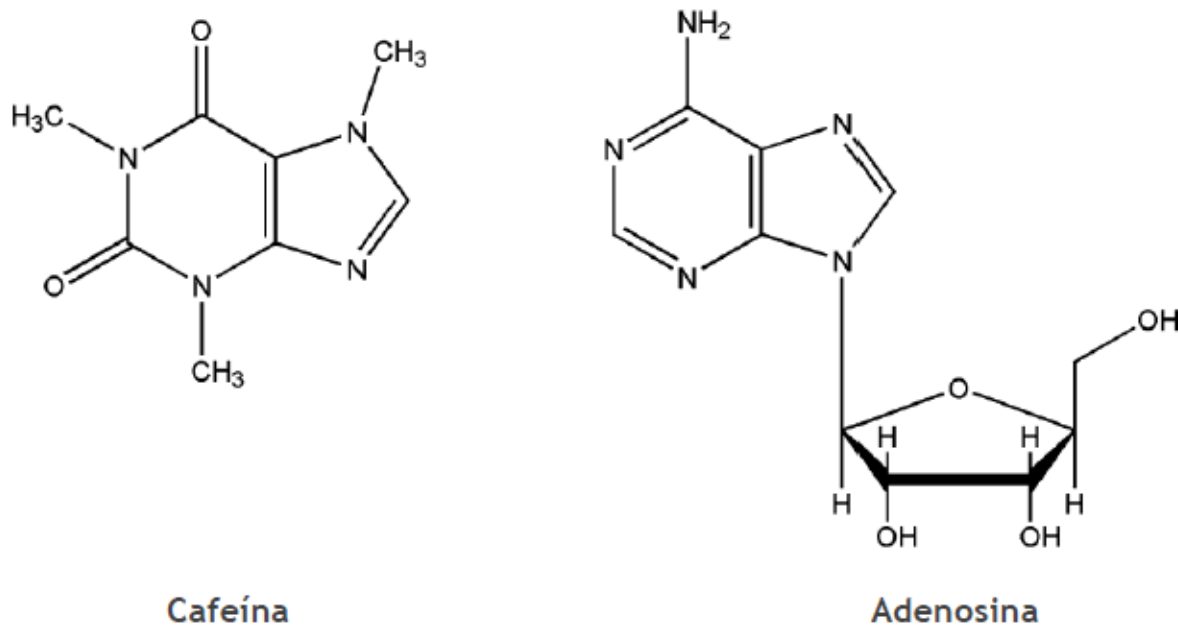
A cafeína (figura 2) quimicamente conhecida por 1,3,7-trimetilxantina, é uma substância estimulante mais consumida no mundo (SVILAAS ET AL., 2004). Existem mais de 60 espécies de plantas que fornecem cafeína, sendo as mais conhecidas o café, o chá, o cacau, erva mate e o guaraná. O conteúdo de cafeína presente em diversos produtos e bebidas

depende da planta utilizada e do modo de preparo. O café é a principal fonte de cafeína e pode fornecer de 40 a 180 mg de cafeína por 150 ml de bebida. Esta diferença deve-se ao tipo de grão utilizado e ao modo de preparo (BARONE E ROBERTS, 1996). O consumo mundial de cafeína é estimado em 70 a 76 mg/pessoa/dia, sendo que nos Estados Unidos e Canadá é de 210 a 238 mg/dia e pode chegar a mais de 400 mg/pessoa/dia em países como Suécia e Finlândia (BARONE E ROBERTS, 1996). A dose letal de cafeína em humanos é em torno de 200 mg/kg, o que equivale a 80-100 copos médios de café (FREDHOLM ET AL., 1999). A cafeína é completamente absorvida pelo trato gastrointestinal após 45 minutos de sua ingestão. Nos adultos saudáveis a meia vida é de aproximadamente 3 a 4 horas, enquanto que em ratos é em torno de 1 hora (FREDHOLM E BATTIG, 1999). A cafeína, por ser uma molécula hidrofóbica, tem sua passagem facilitada em todas as membranas biológicas (LACHANCE ET AL., 1983, TANAKA ET AL., 1984), sendo metabolizada principalmente no fígado pelas enzimas do sistema citocromo P450 em dimetilxantinas, como a paraxantina, teobromina e teofilina. Cada um destes metabólitos tem suas funções no organismo, sendo excretados na urina depois de metabolizados. As metilxantinas são estruturalmente similares aos nucleotídeos cíclicos e têm sido amplamente estudadas pela capacidade de interagir com as fosfodiesterases. Cafeína e teofilina atuam como inibidores competitivos das isoenzimas da fosfodiesterase em vários tecidos, incluindo o cérebro (VERNIKOS-DANELIS E HARRIS, 1968).

Acredita-se que a cafeína possua mecanismos de ação central e periférico que desencadeariam importantes alterações metabólicas e fisiológicas, e que a ação estimulante da cafeína no sistema nervoso central envolva a estimulação do sistema nervoso simpático, aumentando a liberação e, conseqüentemente a ação das catecolaminas, dopamina, serotonina e acetilcolina ocasionando um aumento da atividade neuronal, diminuindo o fluxo sanguíneo cerebral e conseqüentemente, aumentando o seu metabolismo em função da vasoconstrição



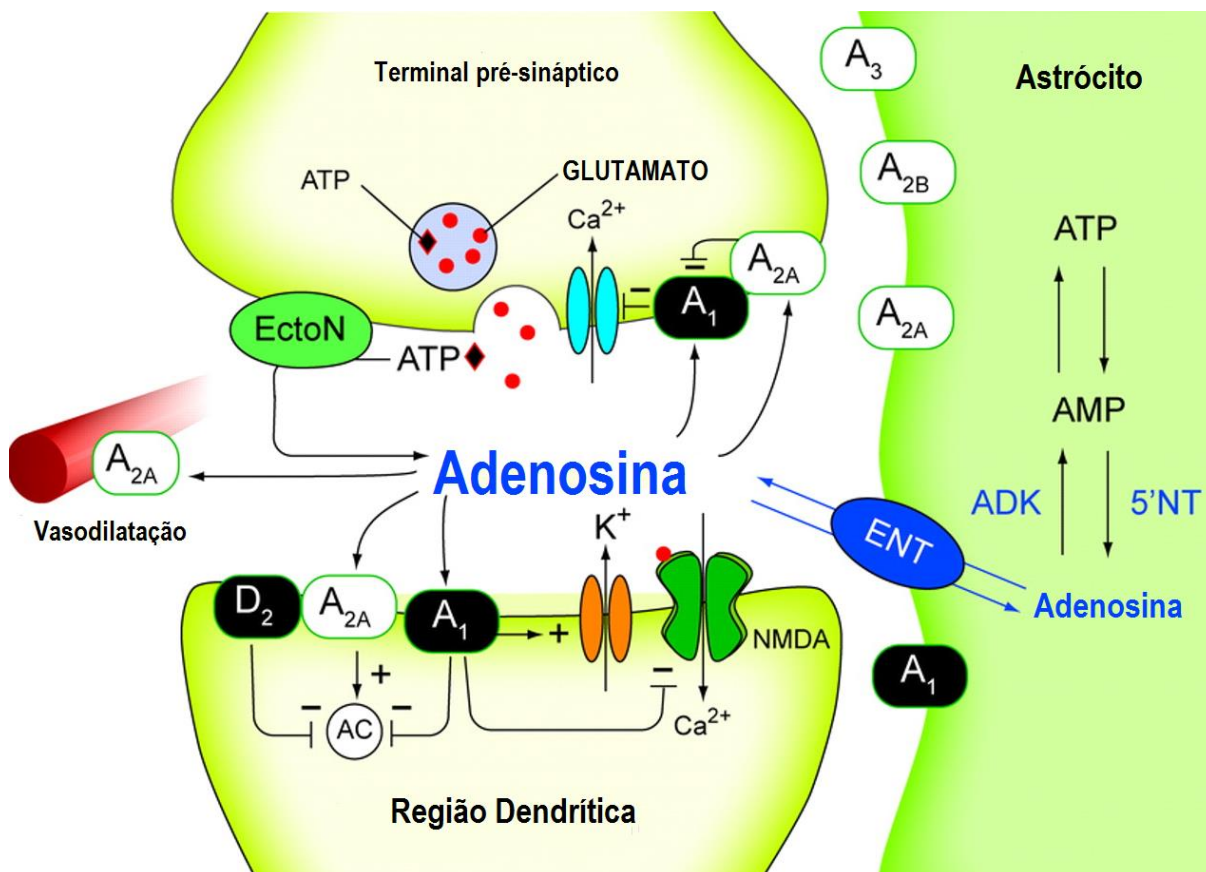
causada pelas catecolaminas e pela inibição do efeito vasodilatador da adenosina (RACHIMAMAOZ ET AL., 1998, SIEPMANN E KIRCH, 2002).



**Figura 2.** Estruturas moleculares da cafeína e a adenosina. Adaptado por Higdon e colaboradores (HIGDON E FREI, 2006).

A adenosina é um ribonucleosídeo (figura 2) constituído por uma base púrica (adenina) ligada a uma pentose (D-ribose) que está envolvida em funções cruciais no SNC tais como neuromodulação da transmissão sináptica e neuroproteção, também atuando como uma molécula sinalizadora extracelular. A adenosina liberada modula a atividade do sistema nervoso através da inibição ou facilitação da liberação de neurotransmissores pré-sinápticos, pela hiperpolarização ou despolarização dos neurónios pós-sinápticos e atuando nas células da glia. A adenosina por não ser liberada em vesículas sinápticas, mas através de transportadores específicos, é considerada um neuromodulador e não um neurotransmissor (RIBEIRO ET AL., 2003). Atualmente quatro diferentes subtipos de receptores de adenosina foram clonados e identificados em humanos e roedores, receptores dos tipos A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (figura 3), sendo que todos os subtipos são acoplados a proteínas G (FREDHOLM ET AL., 2003, SEBASTIAO E

RIBEIRO, 2009). Os receptores  $A_1$  e  $A_3$  estão acoplados a proteínas G inibitórias enquanto os receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  estão acoplados a proteínas G estimulatórias (FREDHOLM ET AL., 2001).



**Figura 3.** Reresentação esquemática da síntese de adenosina e seu mecanismo de ação no sistema nervoso central. 5'NT – 5'nucleotidase; AC – adenilato ciclase; ADK – adenosina quinase; AMP – adenosina monofosfato; ATP – adenosina trifosfato; EctoN – ectonucleotidasas; ENT – transportador de nucleosídeos; NMDA – N-metil-D-aspartato, adaptado de (BENARROCH, 2008).

A cafeína é considerada um psicoestimulante, cujo alvo molecular é o bloqueio não-seletivo dos receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  (FREDHOLM E BATTIG, 1999). Concentrações fisiológicas de adenosina estimulam facilmente os receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , enquanto os receptores  $A_{2B}$  são ativados somente com concentrações elevadas de adenosina, por isso, a administração de cafeína parece melhorar o desempenho cognitivo em humanos e animais, embora esse efeito tenha sido mais bem caracterizado em animais (DE MENDONCA E CUNHA, 2010, NEHLIG ET AL., 2010, RIBEIRO E SEBASTIAO, 2010). Sugere-se que parte desses efeitos seja causado pelo bloqueio preferencial dos receptores  $A_{2A}$  e não dos receptores  $A_1$

(FREDHOLM ET AL., 2005). Os receptores de adenosina  $A_1$  quando ativados, provocam a inibição da liberação de vários neurotransmissores, como o glutamato e a dopamina (BRUNDEGE E DUNWIDDIE, 1996). A cafeína, agindo nesses receptores, inibe os efeitos da adenosina provocando efeitos estimulantes (HOEXTER ET AL., 2005). A ação da cafeína como antagonista dos receptores  $A_{2A}$  provoca um aumento da atividade motora pela interação destes receptores com os receptores de dopamina (FISONE ET AL., 2004).

Estudos demonstraram que o bloqueio dos receptores  $A_{2A}$  medeiam a neuroproteção através das vias de sinalização operadas pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e facilitam a modulação da transmissão sináptica pelo BDNF nas sinapses do hipocampo (DIOGENES ET AL., 2004, STONE ET AL., 2009), ativando principalmente os receptores de tirosina quinase B (TrkB) (CHEN E WEBER, 2004), iniciando uma cascata de sinalização intracelular, como a ativação da Akt e CREB (VIOLA ET AL., 2000, SAKAMOTO E KARELINA, 2011) que podem promover neuroproteção, diferenciação celular, sobrevivência neuronal, migração, arborização dendrítica, sinaptogênese, e plasticidade sináptica (POLLOCK ET AL., 2001, ALONSO ET AL., 2002, TYLER ET AL., 2002, SILHOL ET AL., 2008, GREENBERG ET AL., 2009). Evidências demonstram que os níveis de TrkB (CROLL ET AL., 1998, SILHOL ET AL., 2005), alterações da expressão de CREB (SUZUKI ET AL., 2011, CECHELLA ET AL., 2014), bem como uma modificação do imunoconteúdo do BDNF e/ou da expressão de seus receptores tem sido descrito durante o envelhecimento normal e podem estar associados com atrofia ou morte neuronal (SILHOL E ARANCIBIA, 2008, TAPIA-ARANCIBIA ET AL., 2008).

### **1.3 Exercício e qualidade de vida**

A atividade física é considerada um dos fatores mais importantes, acessíveis e de baixo custo para prevenir e proteger as funções cerebrais (KRAMER E ERICKSON, 2006). Estudos utilizando a natação com um modelo animal de exercício de treinamento revelaram a ocorrência de adaptação ao treinamento de exercício físico similar ao observado em seres

humanos (VOLTARELLI ET AL., 2002). O exercício tem sido proposto como uma das formas de manter a saúde cerebral e proteger da perda do déficit cognitivo progressivo associado com o envelhecimento (MEEUSEN, 2005, PIETRELLI ET AL., 2012). As alterações cognitivas que surgem em idosos saudáveis não são estáticas nem unitárias, havendo algumas capacidades que declinam mais rapidamente do que outras (CHRISTENSEN, 2001). Além disso, as alterações de memória variam muito de pessoa para pessoa, uma vez que existe uma combinação de fatores como saúde, atividade física, hábitos alimentares, motivação, personalidade, estimulação cognitiva, atividade social, alterações no funcionamento emocional ou práticas cotidianas entre outros que acabam por influenciar de alguma forma todo o processo de envelhecimento.

A atividade física atenua o processo natural do envelhecimento, através da manutenção de um estado saudável, principalmente do cérebro, afastando os fatores de risco comuns à terceira idade promovendo uma melhor qualidade de vida (MEIRELLES, 1997, COTMAN E ENGESSE-CESAR, 2002). Sabe-se que com o avanço da idade cronológica, as pessoas tornam-se menos ativas e com as alterações psicológicas que acompanham a idade, facilita a aparição de doenças crônicas que contribuem para acelerar o processo de envelhecimento (MATSUDO ET AL., 2000). Evidências indicam que a grande maioria dos idosos apresenta nível elevado de comprometimento funcional, dependência e solidão (BALTES E SMITH, 2006).

A perda de memória por causa da idade está associada com a diminuição da neurogênese e o aumento da apoptose no giro denteado do hipocampo. A consequência desta redução no número de células observadas no envelhecimento é o declínio das funções cognitivas relacionadas às habilidades verbais, visuais e temporais. A morte celular por apoptose é normal durante o envelhecimento, porém sugere-se que o exercício físico seja uma ótima estratégia na prevenção do déficit de memória decorrente do envelhecimento (KIM ET AL., 2010). Estudos realizados com animais comprovaram que o exercício previne a apoptose no

hipocampo e facilita a recuperação de danos cerebrais causados pelo envelhecimento, melhora o aprendizado e a memória (LEE ET AL., 2006, VAN PRAAG, 2009). A atividade física regular e bem orientada, sendo ela aeróbica ou com pesos, proporciona muitos benefícios como a prevenção de doenças, manutenção do corpo forte e resistente e melhora as relações sociais. O exercício também é essencial para manter a independência funcional em idosos, pois contribui para a aptidão cardiorrespiratória, a força muscular, a coordenação, o equilíbrio e a flexibilidade, reduzindo o risco de quedas e fraturas (DUARTE ET AL., 2002, BARNES ET AL., 2003). Hábitos saudáveis como não fumar, não ingerir bebidas alcoólicas, alimentação balanceada, repouso diário entre 7 a 8 horas, controle do estresse e vida social ativa também auxiliam na promoção e na manutenção da qualidade de vida (CIVINSKI ET AL., 2011).

Assim o déficit na memória decorrente do processo de envelhecimento evidencia a importância da busca de novas estratégias terapêuticas, bem como o estudo dos mecanismos envolvidos (BRUNBECH E SABERS, 2002). Portanto, este estudo pretende contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que associem exercício físico e a cafeína, para a memória.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Avaliar o efeito da associação da administração de cafeína e do exercício físico aeróbico na memória e nas alterações moleculares em ratos de meia idade.

### **2.2 Objetivos específicos**

Considerando os aspectos mencionados, os objetivos específicos deste estudo compreendem:

- ✓ Verificar se a administração de cafeína e o exercício físico de natação melhoram o desempenho de ratos de meia idade em tarefas comportamentais de aprendizado e memória;
- ✓ Determinar se a administração de cafeína e o exercício físico de natação modificam os níveis hipocampais da proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB) e da proteína quinase serina/treonina (Akt) em ratos de meia idade;
- ✓ Avaliar se a administração de cafeína e o exercício físico de natação alteram a captação de glutamato no hipocampo de ratos de meia idade.

### **3 DESENVOLVIMENTO**

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados na forma de um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas do manuscrito estão dispostos de acordo com a recomendação do periódico científico no qual está submetido.

### 3.1 Manuscrito

**Cafeína suprime a melhora na memória de longa duração e de localização induzida pelo exercício em ratos de meia-idade: Envolvimento da sinalização hipocampal de CREB e Akt**

**Caffeine suppresses exercise-enhanced long-term and location memory in middle-aged rats: Involvement of hippocampal Akt and CREB signaling**

José L. Cechella, Marlon R. Leite, Juliana T. da Rocha, Fernando Dobrachinski, Bibiana M. Gai, Félix A. A. Soares, Guilherme Bresciani, Luiz F. F. Royes, Gilson Zeni



Caffeine suppresses exercise-enhanced long-term and location memory in middle-aged rats:

Involvement of hippocampal Akt and CREB signaling

José L. Cechella,<sup>1</sup> Marlon R. Leite,<sup>1</sup> Juliana T. da Rocha,<sup>1</sup> Fernando Dobrachinski,<sup>2</sup> Bibiana M. Gai, Félix A. A. Soares,<sup>2</sup> Guilherme Bresciani,<sup>3</sup> Luiz F. F. Royes,<sup>3</sup> Gilson Zeni<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênios, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Bioquímica do Exercício, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

\*Correspondence should be sent to:

Gilson Zeni

Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brasil.

Phone: 55-55-3220-8140

FAX: 55-55-3220-8978

E-mail: [gzeni@quimica.ufsm.br](mailto:gzeni@quimica.ufsm.br)

**Abstract**

The cognitive function decline is closely related with brain changes generated by age. The ability of caffeine and exercise to prevent memory impairment has been reported in animal models and humans. The purpose of the present study was to investigate whether swimming exercise and caffeine administration enhance memory in middle-aged Wistar rats. Male Wistar Rats (18 months) received caffeine at a dose of 30 mg/kg, 5 days per week by a period of 4 weeks. Animals were subjected to swimming training with a workload (3% of body weight, 20 min per day for 4 weeks). After 4 weeks, the object recognition test (ORT) and the object location test (OLT) were performed. The results of this study demonstrated that caffeine suppressed exercise-enhanced long-term (ORT) and spatial (OLT) memory in middle-aged and this effect may be related to a decrease in hippocampal p-CREB signaling. This study also provided evidence that the effects of this protocol on memory were not accompanied by alterations in the levels of activated Akt. The [<sup>3</sup>H] glutamate uptake was reduced in hippocampus of rats administered with caffeine and submitted to swimming protocol.

**Key words:** caffeine, memory, exercise, CREB, AKT, middle-aged.

## 1. Introduction

Aging is a set of processes, which contribute to health deterioration, and the optimal treatment to prevent or delay the onset of the age related diseases is the intervention in the basic process of aging [5]. Previous studies have demonstrated the greatest benefits of aerobic physical activity [4, 22]. Physical activity is considered one of the most important and accessible factors to prevent and protect brain functions at low cost [25]. Extensive evidence from animal and human studies [11, 27] suggests that exercise has a positive impact on cognitive [23, 25, 37] and emotional aspects of behavior [28]. Moreover, exercise [20, 35] and caffeine [40] protect the brain against neurodegenerative disorders.

In addition, studies aimed to understand the neurobiological bases of these benefits have demonstrated that exercise modifies neuronal activity [10, 33], and cell proliferation [43]. Many of these alterations have been observed in hippocampal formation, a brain region linked to learning, memory, and emotional processes [21, 24] and highly susceptible to damage in neurodegenerative diseases [19]. Although the exact neurobiological bases underlying the cognitive benefits of physical exercise remain to be elucidated, considerable evidence supports the importance of adaptive neuronal responses in the central nervous system (CNS), such as increased synaptic plasticity [11, 15, 43], neurogenesis [44] and production of neurotrophic factors – most notably the brain derived neurotrophic factor (BDNF) [2, 11].

Caffeine is present in many commercial beverages and medicines and its concomitant use with habitual exercise or sports training may alter the physiological response to exertion [42]. Caffeine is the most widely consumed CNS stimulant and acts as a competitive antagonist of adenosine receptors [48]. The ability of caffeine to prevent memory impairment has been reported in animal models and humans. [13, 36]. In contrast, another study that evaluated chronic caffeine administration failed to find improved performance in a

battery of cognitive and motor tests, in comparison with animals that consumed only water [3].

This study was designated to investigate whether swimming exercise and caffeine administration enhance memory in middle-aged Wistar rats.

## 2. Results

### 2.1 Short-term memory

There was no significant difference among groups in the total time exploring both objects during training (Figure 1A) and in the time exploring the novel object during the STM test ( $P=0.228$ ) (Figure 1B).

### 2.2 Long-term memory

Figure 1C shows that caffeine administration to middle-aged male rats impaired recognition index ameliorated by swimming exercise in the LTM test. The two-way ANOVA of percentage of preference demonstrated a significant caffeine and swimming exercise interaction ( $F_{(1,27)}= 4.29$ ;  $p<0.05$ ).

### 2.3 Object Location Test

Figure 2 show that swimming exercise reduced the recognition index enhanced by administration of caffeine to middle-aged rats in the OLT test. The two-way ANOVA of percentage of preference demonstrated a significant caffeine exposure and swimming exercise interaction ( $F_{(1,27)}= 14.41$ ;  $p<0.0007$ ).

### 2.4 Activity Chamber

Table 1 shows that there was no significant difference among groups in the velocity and distance traveled.

## 2.5 [<sup>3</sup>H] glutamate uptake

[<sup>3</sup>H] glutamate uptake in hippocampal slices was reduced in middle-aged rats which received caffeine administration and in animals submitted to swimming exercise and administered with caffeine (Figure 3). The two-way ANOVA of [<sup>3</sup>H] glutamate uptake revealed a significant difference for caffeine exposure ( $F_{(1,8)} = 10.45$ ;  $p < 0.0037$ ).

## 2.6 CREB and AKT

As illustrated in Figures 4A and 4B, two-way ANOVA revealed that p-Akt levels increased in the hippocampus of middle-age rats after the swimming exercise protocol ( $F_{(1,8)} = 12.84$ ;  $p < 0.0071$ ).

Caffeine and swimming exercise protocol increased p-CREB levels in the hippocampus of middle-age rats. Rats submitted to swimming training protocol and exposed to caffeine showed a decrease in the levels of p-CREB. The two-way ANOVA of data demonstrated a significant exercise x caffeine interaction ( $F_{(1,8)} = 68.35$ ;  $p < 0.000034$ ) (Figures 4C and 4D).

## 3. Discussion

The influence of physical exercise or caffeine on memory has been extensively investigated [7, 32, 36]. The most relevant contribution of this study is the demonstration that interactions between exercise and caffeine exposure do not necessarily respond in a pre-established manner, thereby emphasizing the complexity of the modulation of memory and motor skills in regard to these stimuli.

The results of the present study demonstrate that administration of caffeine suppressed swimming exercise-enhanced long-term and location memory in middle-aged rats and this effect may be related to a decrease in hippocampal p-CREB signaling. The swimming has been chosen as a suitable model of endurance exercise training since it is a natural behavior of rodents [26]. In this context, studies using swimming as an animal model of training exercise revealed the occurrence of adaptation to physical exercise training similar to those observed in human beings [45]. Studies suggest that exercise helps in maintaining brain health and protects against the progressive cognitive deficits associated with aging [32, 37]. A decrease in p-CREB levels is associated with age-induced memory impairment [29] and deterioration of hippocampal plasticity [46]. The p-CREB promotes the synthesis of a wide array of proteins implicated in neuronal plasticity (Impey et al. 2004), which makes CREB well suited for regulation of long-term memory formation. In this study the swimming exercise protocol was effective in improving memory and spatial learning in middle-age rats that were accompanied by the activation of hippocampal Akt and CREB.

The benefits of physical exercise in memory are explained by the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/tyrosine kinase B (PI3-K/TrkB) via [8, 9] and the consequent increase of p-Akt and p-CREB levels. Cassilhas and collaborators [7] demonstrate an increase in the hippocampal levels of mature BDNF and TrkB receptor of rats subjected to a protocol of aerobic exercise. Although the levels of BDNF and TrkB were not determined in this study, an increase in the expression of p-Akt and p-CREB was observed, which could be related to the improvement of the long-term memory and memory location in the exercise group.

By contrast, caffeine administration did not alter memory of animals in the ORT but improved spatial memory in the OLT. Caffeine exerts multiple effects on cells. At the low doses of caffeine achieved by dietary intake (1–10  $\mu$ M), the primary effect of caffeine in the

CNS is believed to be inhibition of adenosine receptors and subsequent modulation of neurotransmitter release [17, 18]. But high doses of caffeine can block GABA-A receptors, reducing the inhibitory input in functional neuronal networks, inhibit phosphodiesterase activity leading to increased cellular cAMP levels which in turn triggers CREB phosphorylation [49]. This way, one can suppose that the improvement of memory in the OLT could be due to the increase in p-CREB triggered by caffeine.

The contradicting caffeine effects seen in different tests is might be due to difference in psychobiological meanings of various tests. For instance, caffeine ameliorated memory in the OLT but not in the ORT. This inter-test variation suggests the construct differences between these tests assess different aspects of memory. Thus, the variations in caffeine effects observed in this study might be due to the construct difference of these two behavioral paradigms.

In this study the benefits of caffeine or swimming training exercise were restricted to OLT and long-term memory, respectively, since neither swimming exercise nor caffeine or the association of both altered short-term memory of middle-aged rats.

Different from our expectation the association of caffeine and swimming exercise protocol impaired long-term memory and spatial memory ameliorated by caffeine or exercise individually in middle-aged rats. The hippocampal levels of Akt and CREB elucidate, at least in part, the molecular mechanisms by which caffeine and swimming exercise did not ameliorate memory in middle-aged rats. In fact, the levels of activated CREB increased by the exercise protocol returned to the control levels in animals submitted to caffeine and swimming exercise.

It is important to recognize that the effect of caffeine and exercise are not always in accordance with alterations in Akt and pCREB, suggesting that other mechanisms play a role in these pathways.

The biphasic effects of caffeine on locomotion have been widely described, with low doses increasing and high doses decreasing the locomotor activity [16, 31], but in the present study the protocol of caffeine administration failed to cause any effect on the locomotor activity of middle-aged rats. Although Silva and Frussa-Filho [39] demonstrated that treatment with anxiogenic doses of caffeine causes an unsatisfactory performance in learning and memory task, the results presented in this study support the hypothesis that is unlikely that caffeine had triggered an anxiety-like behavior in this protocol. In fact, the distance traveled and speed (parameters of locomotion) and the adrenal weight of middle-aged animals were not altered among groups.

It has been reported that reduced glutamate uptake due to a decrease in the number of glutamate transporters is associated to behavioral and cognitive decline in aging rodents [38]. In a previous study the improvement of spatial learning and memory caused by short bouts of mild exercise was independent of the glutamate uptake in aging rats [1]. Accordingly, in this study the swimming protocol failed in altering the glutamate uptake in the hippocampus of middle-aged rats. By contrast, an increase in the hippocampal glutamate uptake of adult mice submitted to long-term running wheel training was demonstrated [30]. Regarding caffeine administration, the decrease in the glutamate uptake demonstrated in the hippocampus of middle-aged rats helps to explain the improvement of spatial memory caused by caffeine. Unexpectedly, the exercise and caffeine protocol neither improved memory, nor altered the hippocampal levels of p-Akt and p-CREB, although it decreased the hippocampal glutamate uptake in middle-aged rats.

In conclusion the results of the current study demonstrated that caffeine exposure suppressed exercise-enhanced long-term and spatial memory in middle-aged rats. In addition, a connection between caffeine administration and swimming protocol with the reduction of activated CREB to the control levels was reported. This study also provided evidence that the



effects of this protocol on memory were not accompanied by the alterations in the levels of activated Akt.

#### **4. Materials and methods**

##### **4.1 Animals**

Middle-aged male Wistar Rats (18 months-old, weighing 450–550 g) were obtained from a local breeding colony and were housed in cages, with free access to food and water. They were kept in a separate air-conditioned ( $22 \pm 2$  °C) room, on a 12-h light/12-h dark cycle, with lights on at 7:00 a.m. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria, Brazil.

##### **4.2 Drugs**

Caffeine (CAF) was purchased from Sigma-Aldrich (Dorset, UK) and dissolved in warmed phosphate buffered saline (PBS). L-[<sup>3</sup>H]glutamate (specific activity 50 Ci/mmol) was purchased from Amersham International (Amersham, Buckingham, UK). Choline chloride was purchased from Sigma Chemical CO (St. Louis, MO, USA).

##### **4.3 Caffeine administration**

The animals ( $n = 7 - 8$  rats per group) were divided into four groups as follows: sedentary (rats that did not perform swimming exercise) group, sedentary + CAF group, exercise group and exercise + CAF group. Rats were orally treated, by gavage, with CAF (30 mg/kg, 30 min before training) or vehicle (PBS), 5 days per week. The period of treatment was 4 weeks (Scheme 1). The dose of 30 mg/kg, corresponding to the equivalent of 4–6 cups of coffee in humans, causes the maximal behavior effects in rodents [18].

#### 4.4 Exercise training program

For the groups exercise and exercise + CAF, the pre-training period lasted for 5 days, 20 min per day. After the swimming adaptation period, the rats were subjected to swimming training with a workload (3% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) [34] (Scheme 1). Swimming was always performed in water at a temperature of 32 °C between 19:00 and 21:00 p.m. Together with the training session, sedentary and sedentary + CAF rats were placed in the bottom of a separate tank with shallow water (5 cm) at 32 °C, without the workload. At the completion of exercise, rats were towel-dried and returned to their respective cages.

The individual body weight of rats was recorded two times a week for 5 weeks. At the end of protocol, adrenal and epididymal weights were recorded. *Relative (to body weight) adrenal and epididymal weights* were calculated. There were no significant differences between groups in the body weight gain, relative adrenal and epididymal weights (data not shown).

#### 4.5 Behavioral tasks

The choose of object memory tasks was based on the fact that they are ideal to study both short- and long-term memory formation because learning occurs within a single session [47]. A previous pilot experiment performed by our research group demonstrated that age-deficits are apparent in 18 months-old rats on the tasks performed in this study.

##### Object Recognition Test (ORT)

All animals were submitted to a habituation session where they were allowed to freely explore the open field for 5 min. No objects were placed in the box during the habituation trial [12]. Twenty-four hours after arena exploration, training was conducted by placing individual rats for 5 min in the field, in which two identical objects (objects 1A and

2A; duple Lego toys) were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. In a short-term memory (STM) test given 1.5 h after training, the rats explored the open field for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. All objects presented similar textures, colors and sizes, but distinctive shapes. The results were expressed as exploratory preference, a recognition index was calculated for each animal by the ratio  $TB / (TA+TB) \times 100$  [TA=time spent exploring the familiar object A; TB=time spent exploring the novel object B]. Between trials, the objects were washed with 10% ethanol solution. In a long-term memory (LTM) test given 24 h after training, the same rats explored the field for 5 min in the presence of familiar object A and a novel object C.

#### 4.6 Object Location Test (OLT)

The apparatus used for this test was the same field used in the ORT as the LTM objects (object A and object C). The OLT, a hippocampal-dependent spatial memory task, was performed to evaluate potential cognitive deficits resulting from aging. The period of acclimation was performed as in the ORT.

In the sample trial, objects A and C were placed in the apparatus as described in the ORT. After 5 min of the object exploration, the rats were returned to their home cages for a 4 h interval. Subsequently, in the test trial, object C was moved to a location that was diagonally opposite to object A, and the rat was left in the field for 5 min exploration [14]. The time spent exploring novel and familiar objects location was recorded. The exploration criterion and the results were expressed as in ORT.

#### 4.7 Activity Chamber

With the purpose of excluding some motor abnormality, the spontaneous locomotor activity was tested. The animals were pre-exposed to the chamber before testing, and activity was monitored under light and sound-attenuated conditions. Testing took place in a clear

acrylic chamber (500 x 480 x 500 mm) equipped with 16 infrared sensors for the automatic recording of horizontal activity (Model EP149, Insight Instruments Ltda, São Paulo, BR). Each animal initially was placed in the center of the testing chamber and allowed to freely move while being tracked by an automated tracking system. The data (distance traveled and velocity) were collected and recorded during 5 min.

After behavioral test, all animals were killed by decapitation, brains were removed and hippocampus was separated.

#### 4.8 [<sup>3</sup>H] glutamate uptake

The glutamate uptake evaluation was carried out because the reduction in glutamate uptake has been reported in aging rats [38]. The hippocampi were dissected and transverse slices of 0.4 mm were obtained using a McIlwain Tissue Chopper for subsequent analysis. Hippocampal slices (five) were then transferred immediately to 24- well culture plates and washed with 1.0 ml of Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 0.63 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.17 NaHCO<sub>3</sub>, 5.36 KCl, 0.44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.26 CaCl<sub>2</sub>, 0.41 MgSO<sub>4</sub>, 0.49 MgCl<sub>2</sub>, and 5.55 glucose, adjusted to pH 7.2. Glutamate uptake was performed as previously described [41]. After 15 min of pre-incubation, the uptake assay was performed by adding 13.3 μM L-[<sup>3</sup>H]glutamate in 300 μl HBSS at 37 °C. Incubation was terminated after 5 min by three ice-cold washes with 1 ml HBSS immediately followed by the addition of 0.5 M NaOH, which was kept overnight. Unspecific uptake was measured using the same protocol described above, with differences in the temperature (4 °C) and medium composition (choline chloride instead of sodium chloride). Na<sup>+</sup>- dependent uptake was considered as the difference between the total uptake and the unspecific uptake. Both uptakes were performed in triplicate. Incorporated radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (Wallac 1409). Results were expressed as pmol of L-[<sup>3</sup>H]glutamate uptake/mg protein/min.

#### 4.9 Western Blot assay

Samples of hippocampus were homogenized in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, and centrifuged ( $9,800 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 5 min) to concentrate the proteins. The pellet was reconstituted in a buffer solution (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.5 mM KAc, 1% NP-40, and protein inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) and incubated for 30 min on ice followed by 10 min on ultrasonic bath, and then centrifuged ( $3,900 \times g$  for 10 min, at  $4^{\circ}\text{C}$ ). Hippocampal extracts were diluted to a final protein concentration  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  in SDS-PAGE buffer. The samples ( $50 \mu\text{g}$  of protein) and pre stained molecular weight standards (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) were separated on 12% resolving with 4% concentrating SDS-polyacrylamide electrophoresis gels. Proteins were transferred to PVDF membrane using Transfer-Blot® Turbo™ Transfer System (1.0 mA; 0.5 h). After blocking with 5 % BSA solution, the blots were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with rabbit anti-AKT (serine/threonine protein kinase) and rabbit anti-phospho-Akt (Ser 473) (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-CREB (cAMP-response element-binding protein) and rabbit anti-phospho-CREB (Ser 133) (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Rabbit anti- $\alpha$ -actin (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were stained as an additional control of the protein loading. After primary antibodies incubation, membranes were washed and incubated with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) for 1 h at room temperature and developed with chemiluminescence kit (Amersham, São Paulo/Brazil). Optical density (O.D.) of the western blotting bands was quantified using Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) software for Windows. Each value was derived from the ratio between arbitrary units obtained by the protein band and the respective  $\alpha$ -actin band. The results were showed by % of control of quantification of the phosphorylated ratio: O.D. of the phosphorylated band/O.D. of the total band.

#### 4.10 Protein determination

Protein concentration was determined by the method previously described [6] using bovine serum albumin (1 mg/ml) as a standard.

#### 4.11 Statistical Analysis

All experimental results are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using a Two-way ANOVA (interaction of exercise and caffeine) followed by the Duncan's test for post hoc comparison when appropriate. A value of  $P < 0.05$  was considered to be significant. The main effects are presented only when interactions were not significant.

#### Acknowledgments

The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged. The authors thank to FAPERGS/CNPq (PRONEX) research grant #10/0005-1. G.Z. and J.T.R. are recipients of CNPq and FAPERGS/CAPES fellowships, respectively.

#### REFERENCES

- [1] A.S. Aguiar, Jr., A.A. Castro, E.L. Moreira, V. Glaser, A.R. Santos, C.I. Tasca, A. Latini, R.D. Prediger, Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling, *Mech Ageing Dev* 132 (2011) 560-567.
- [2] A.S. Aguiar, Jr., A.E. Speck, R.D. Prediger, F. Kapczinski, R.A. Pinho, Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels, *Journal of Neural Transmission* 115 (2008) 1251-1255.
- [3] G.W. Arendash, T. Mori, C. Cao, M. Mamcarz, M. Runfeldt, A. Dickson, K. Rezai-Zadeh, J. Tane, B.A. Citron, X. Lin, V. Echeverria, H. Potter, Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice, *J Alzheimers Dis* 17 (2009) 661-680.
- [4] L.D. Baker, L.L. Frank, K. Foster-Schubert, P.S. Green, C.W. Wilkinson, A. McTiernan, S.R. Plymate, M.A. Fishel, G.S. Watson, B.A. Cholerton, G.E. Duncan, P.D. Mehta, S. Craft, Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment: a controlled trial, *Arch Neurol* 67 (2010) 71-79.
- [5] N.Z. Baquer, A. Taha, P. Kumar, P. McLean, S.M. Cowsik, R.K. Kale, R. Singh, D. Sharma, A metabolic and functional overview of brain aging linked to neurological disorders, *Biogerontology* 10 (2009) 377-413.

- [6] M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [7] R.C. Cassilhas, K.S. Lee, J. Fernandes, M.G.M. Oliveira, S. Tufik, R. Meeusen, M.T. de Mello, Spatial Memory Is Improved by Aerobic and Resistance Exercise through Divergent Molecular Mechanisms, *Neuroscience* 202 (2012) 309-317.
- [8] C.H. Chae, H.T. Kim, Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats, *Neurochem Int* 55 (2009) 208-213.
- [9] M.J. Chen, A.A. Russo-Neustadt, Running exercise-induced up-regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor is CREB-dependent, *Hippocampus* 19 (2009) 962-972.
- [10] M.S. Costa, A.P. Ardais, G.T. Fioreze, S. Mioranza, P.H. Botton, D.O. Souza, J.B. Rocha, L.O. Porciuncula, The impact of the frequency of moderate exercise on memory and brain-derived neurotrophic factor signaling in young adult and middle-aged rats, *Neuroscience* 222 (2012) 100-109.
- [11] C.W. Cotman, N.C. Berchtold, Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity, *Trends Neurosci* 25 (2002) 295-301.
- [12] M.N. de Lima, D.C. Laranja, F. Caldana, E. Bromberg, R. Roesler, N. Schroder, Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with L-deprenyl, *Exp Gerontol* 40 (2005) 506-511.
- [13] A. de Mendonca, R.A. Cunha, Putative neuroprotective effects of caffeine in clinical trials. Concluding remarks, *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 1 (2010) S249-252.
- [14] R. De Rosa, A.A. Garcia, C. Braschi, S. Capsoni, L. Maffei, N. Berardi, A. Cattaneo, Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 3811-3816.
- [15] B.D. Eadie, V.A. Redila, B.R. Christie, Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density, *J Comp Neurol* 486 (2005) 39-47.
- [16] M. El Yacoubi, C. Ledent, J.F. Menard, M. Parmentier, J. Costentin, J.M. Vaugeois, The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors, *Br J Pharmacol* 129 (2000) 1465-1473.
- [17] S. Ferre, An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine, *J Neurochem* 105 (2008) 1067-1079.
- [18] B.B. Fredholm, K. Battig, J. Holmen, A. Nehlig, E.E. Zvartau, Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use, *Pharmacol Rev* 51 (1999) 83-133.
- [19] G.J. Harry, C. Lefebvre d'Hellencourt, Dentate gyrus: alterations that occur with hippocampal injury, *Neurotoxicology* 24 (2003) 343-356.
- [20] R.A. Honea, G.P. Thomas, A. Harsha, H.S. Anderson, J.E. Donnelly, W.M. Brooks, J.M. Burns, Cardiorespiratory fitness and preserved medial temporal lobe volume in Alzheimer disease, *Alzheimer Dis Assoc Disord* 23 (2009) 188-197.
- [21] M.E. Hopkins, D.J. Bucci, BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory, *Neurobiol Learn Mem* 94 (2010) 278-284.

- [22] K. Kamijo, Y. Hayashi, T. Sakai, T. Yahiro, K. Tanaka, Y. Nishihira, Acute effects of aerobic exercise on cognitive function in older adults, *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 64 (2009) 356-363.
- [23] K. Kashihara, T. Maruyama, M. Murota, Y. Nakahara, Positive effects of acute and moderate physical exercise on cognitive function, *J Physiol Anthropol* 28 (2009) 155-164.
- [24] R.P. Kesner, I. Lee, P. Gilbert, A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis, *Rev Neurosci* 15 (2004) 333-351.
- [25] A.F. Kramer, K.I. Erickson, S.J. Colcombe, Exercise, cognition, and the aging brain, *J Appl Physiol* 101 (2006) 1237-1242.
- [26] K. Kramer, H. Dijkstra, A. Bast, Control of physical exercise of rats in a swimming basin, *Physiol Behav* 53 (1993) 271-276.
- [27] J.A. Markham, W.T. Greenough, Experience-driven brain plasticity: beyond the synapse, *Neuron Glia Biol* 1 (2004) 351-363.
- [28] E.W. Martinsen, Physical activity in the prevention and treatment of anxiety and depression, *Nord J Psychiatry* 62 Suppl 47 (2008) 25-29.
- [29] K.A. Morris, P.E. Gold, Age-related impairments in memory and in CREB and pCREB expression in hippocampus and amygdala following inhibitory avoidance training, *Mech Ageing Dev* 133 (2012) 291-299.
- [30] A.P. Muller, J. Gnoatto, J.D. Moreira, E.R. Zimmer, C.B. Haas, F. Lulhier, M.L. Perry, D.O. Souza, I. Torres-Aleman, L.V. Portela, Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice, *Hippocampus* 21 (2011) 1082-1092.
- [31] O. Nikodijevic, K.A. Jacobson, J.W. Daly, Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal, *Pharmacol Biochem Behav* 44 (1993) 199-216.
- [32] A. Pietrelli, J. Lopez-Costa, R. Goni, A. Brusco, N. Basso, Aerobic Exercise Prevents Age-Dependent Cognitive Decline and Reduces Anxiety-Related Behaviors in Middle-Aged and Old Rats, *Neuroscience* 202 (2012) 252-266.
- [33] R.D. Prediger, A.E. Rojas-Mayorquin, A.S. Aguiar, Jr., C. Chevarin, R. Mongeau, M. Hamon, L. Lanfumey, E. Del Bel, H. Muramatsu, J. Courty, R. Raisman-Vozari, Mice with genetic deletion of the heparin-binding growth factor midkine exhibit early preclinical features of Parkinson's disease, *J Neural Transm* 118 (2011) 1215-1225.
- [34] T. Ravi Kiran, M.V. Subramanyam, S. Asha Devi, Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 137 (2004) 187-196.
- [35] Y. Rolland, G. Abellan van Kan, B. Vellas, Physical activity and Alzheimer's disease: from prevention to therapeutic perspectives, *J Am Med Dir Assoc* 9 (2008) 390-405.
- [36] C. Sallaberry, F. Nunes, M.S. Costa, G.T. Fioreze, A.P. Ardais, P.H. Botton, B. Klaudat, T. Forte, D.O. Souza, E. Elisabetsky, L.O. Porciuncula, Chronic caffeine prevents changes in inhibitory avoidance memory and hippocampal BDNF immunocontent in middle-aged rats, *Neuropharmacology* 64 (2013) 153-159.
- [37] P. Sampedro-Piquero, C. Zancada-Menendez, A. Begega, M. Mendez, J.L. Arias, Effects of forced exercise on spatial memory and cytochrome c oxidase activity in aged rats, *Brain Res* 1502 (2013) 20-29.
- [38] G. Segovia, A. Porras, A. Del Arco, F. Mora, Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective, *Mech Ageing Dev* 122 (2001) 1-29.



- [39] R.H. Silva, R. Frussa-Filho, The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine, *J Neurosci Methods* 102 (2000) 117-125.
- [40] K. Singh, S. Singh, N.K. Singhal, A. Sharma, D. Parmar, M.P. Singh, Nicotine- and caffeine-mediated changes in gene expression patterns of MPTP-lesioned mouse striatum: Implications in neuroprotection mechanism, *Chem Biol Interact* 185 (2010) 81-93.
- [41] A.P. Thomazi, G.F. Godinho, J.M. Rodrigues, F.D. Schwalm, M.E. Frizzo, E. Moriguchi, D.O. Souza, S.T. Wofchuk, Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine, *Mech Ageing Dev* 125 (2004) 475-481.
- [42] J.M. Tunncliffe, K.A. Erdman, R.A. Reimer, V. Lun, J. Shearer, Consumption of dietary caffeine and coffee in physically active populations: physiological interactions, *Appl Physiol Nutr Metab* 33 (2008) 1301-1310.
- [43] H. van Praag, B.R. Christie, T.J. Sejnowski, F.H. Gage, Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 13427-13431.
- [44] H. van Praag, G. Kempermann, F.H. Gage, Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus, *Nat Neurosci* 2 (1999) 266-270.
- [45] F.A. Voltarelli, C.A. Gobatto, M.A.R. de Mello, Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35 (2002) 1389-1394.
- [46] Z. Wei, C. Belal, W. Tu, S. Chigurupati, N.J. Ameli, Y. Lu, S.L. Chan, Chronic nicotine administration impairs activation of cyclic AMP-response element binding protein and survival of newborn cells in the dentate gyrus, *Stem Cells Dev* 21 (2012) 411-422.
- [47] M.E. Wimmer, P.J. Hernandez, J. Blackwell, T. Abel, Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice, *Neurobiol Aging* 33 (2012) 2220-2224.
- [48] J.N. Yang, J.F. Chen, B.B. Fredholm, Physiological roles of A1 and A2A adenosine receptors in regulating heart rate, body temperature, and locomotion as revealed using knockout mice and caffeine, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296 (2009) H1141-1149.
- [49] H. Yoshimura, The potential of caffeine for functional modification from cortical synapses to neuron networks in the brain, *Curr Neuropharmacol* 3 (2005) 309-316.

### Legend of figures

**Figure 1.** Effect of caffeine exposure (30 mg/kg, p.o.; for 4 weeks, 5 days week) and swimming exercise on total time exploring in the training (A), the short-term memory (STM) (B) and long-term memory (LTM) (C) of middle-aged male rats in the object recognition test. Object recognition test was carried out 72 h after the last training exercise. Recognition memory test was performed after 1.5 h and 24 h of training for the STM and LTM, respectively. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 7 - 8 rats per group). Data were

analyzed by Two-way ANOVA followed by the Duncan's post hoc test. \*  $P < 0.05$  as compared to sedentary rats; #  $P < 0.05$  as compared to rats submitted to exercise.

*Abbreviations:* Sed – Sedentary; CAF – Caffeine; Ex – Exercise.

**Figure 2.** Effect of caffeine exposure (30 mg/kg, p.o.; for 4 weeks, 5 days week) and swimming exercise on the object location test of middle-aged male rats. Object location test was performed after 4 h training for LTM. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 6-9 rats per group). Data were analyzed by Two-way ANOVA followed by the Duncan's post hoc test. \*  $P < 0.05$  as compared to sedentary rats; <sup>a</sup>  $P < 0.05$  as compared to rats exposed to caffeine. *Abbreviations:* Sed – Sedentary; CAF – Caffeine; Ex – Exercise.

**Figure 3.** Effect of caffeine exposure (30 mg/kg, p.o.; for 4 weeks, 5 days week) and swimming exercise on the hippocampal glutamate uptake of middle-age male rats. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3 rats per group). Data were analyzed by Two-way ANOVA followed by the Duncan's post hoc test. \*  $P < 0.05$  as compared to sedentary rats; #  $P < 0.05$  as compared to rats submitted to exercise. *Abbreviations:* Sed – Sedentary; CAF – Caffeine; Ex – Exercise.

**Figure 4.** Effect of caffeine exposure (30 mg/kg, p.o.; for 4 weeks, 5 days week) and swimming exercise on p-Akt (A) and a representative assay of Western blot of Akt (B), and on p-CREB (C) and a representative assay of Western blot of CREB (D) in the hippocampus of middle-age male rats. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 3 rats per group). Data were analyzed by Two-way ANOVA followed by the Duncan's post hoc test. \*  $P < 0.05$  as compared to sedentary rats; #  $P < 0.05$  as compared to rats submitted to exercise; <sup>a</sup>  $P < 0.05$  as compared to rats exposed to caffeine. *Abbreviations:* Sed – Sedentary; CAF – Caffeine; Ex – Exercise.

Figure 1

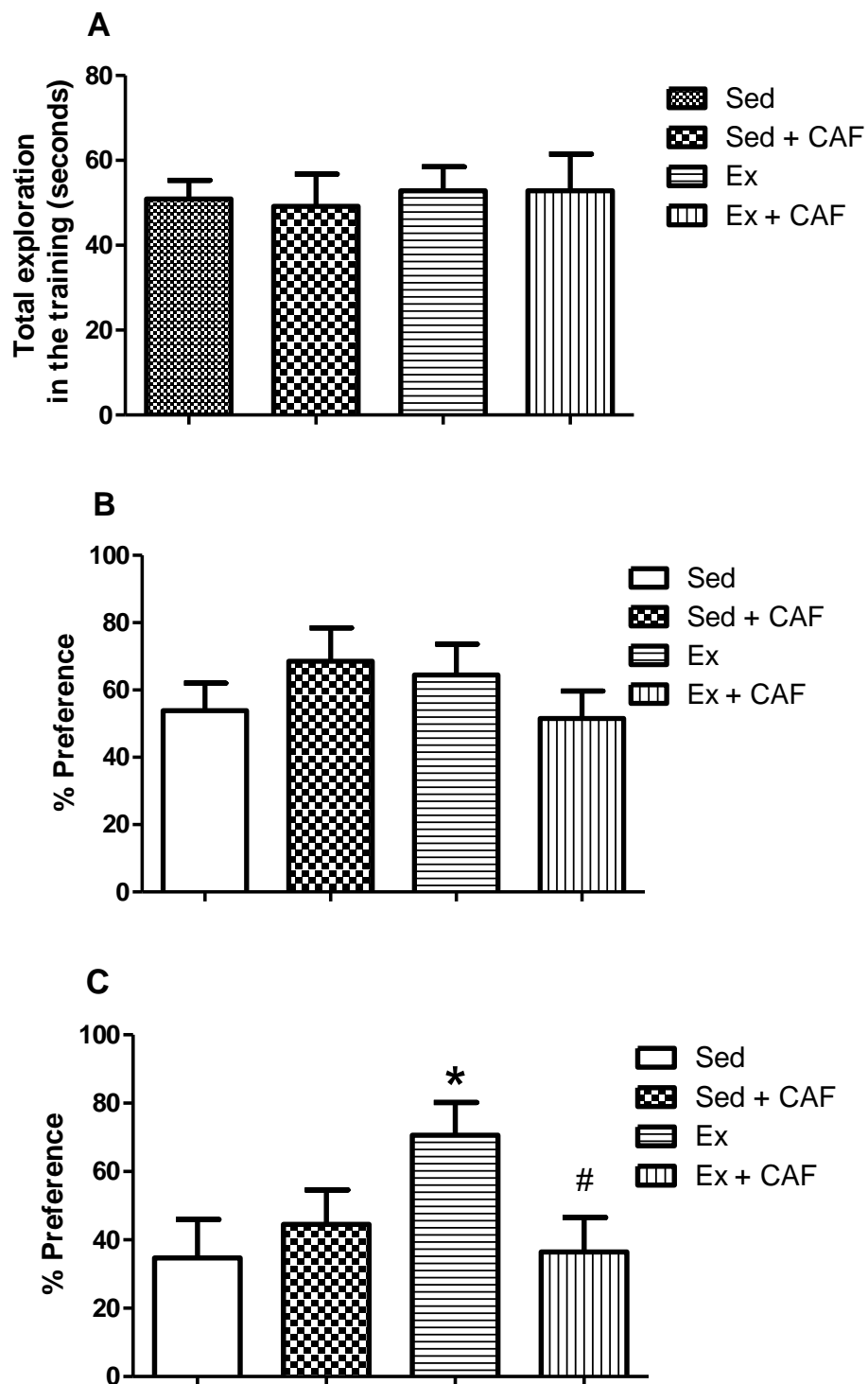


Figure 2

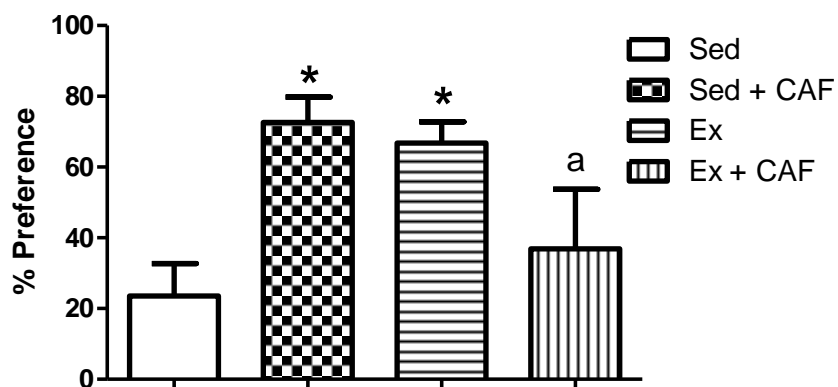


Figure 3

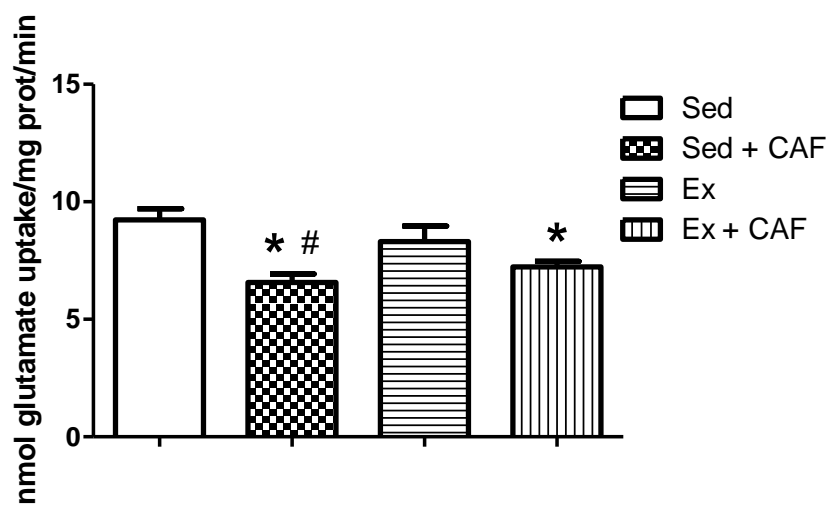
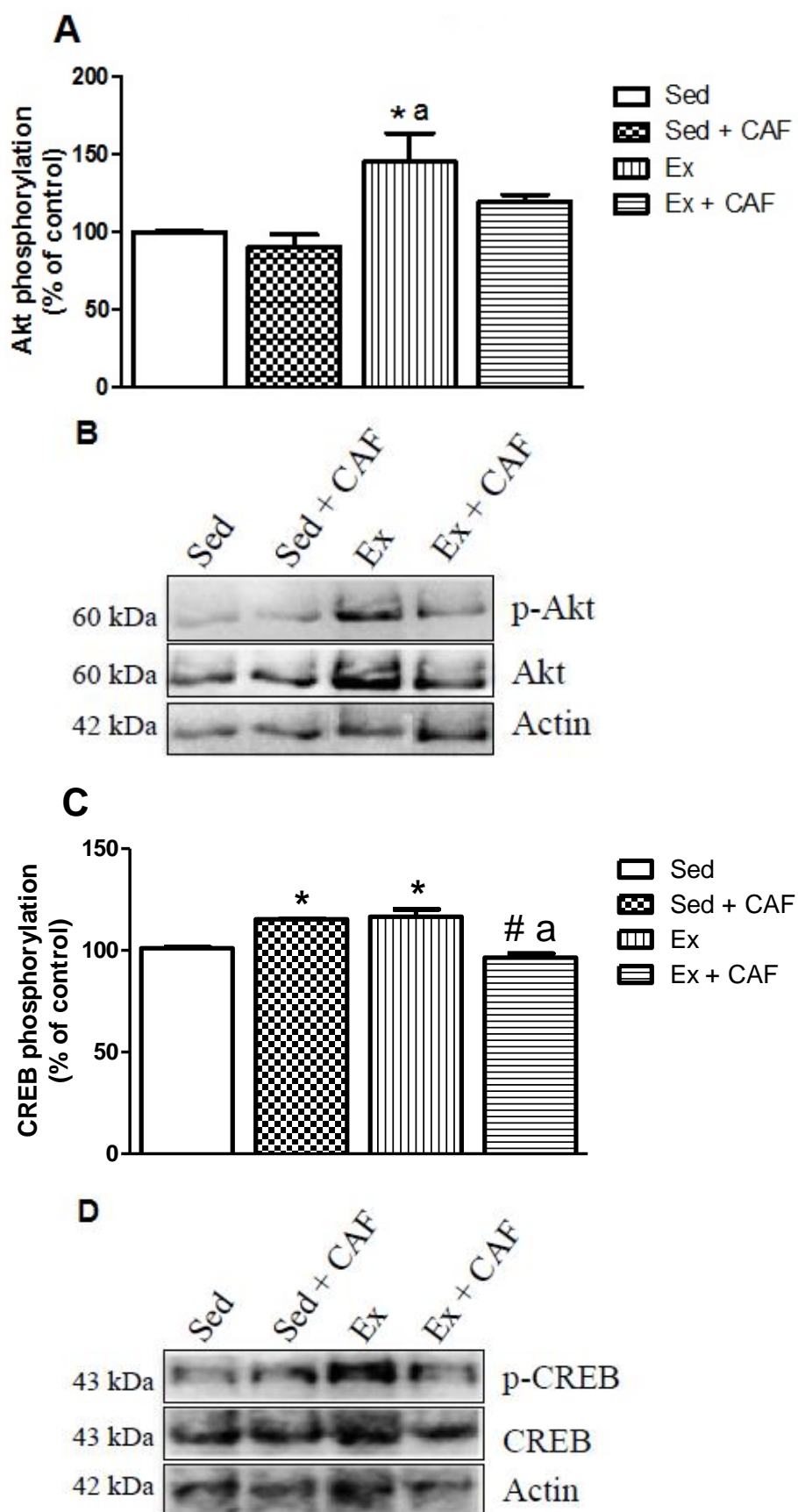
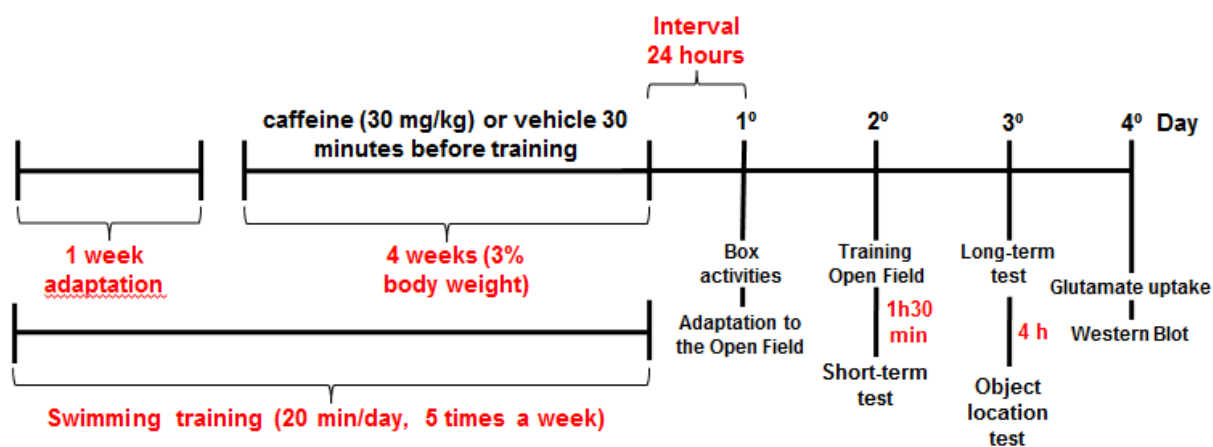


Figure 4



Scheme 1



## Tables

Table 1. Effect of caffeine exposure and swimming exercise on the locomotor behavior of middle-aged rats.

	Distance (meters)	Speed (mm/s)
Sedentary	2.333 ±0.441	13.973 ±2.472
Sedentary + Caffeine	3.159 ±0.462	15.794 ±2.708
Exercise	2.436 ±0.441	9.308 ±2.472
Exercise + Caffeine	2.264 ±0.488	13.484 ±2.708

## 4 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstraram que:

- ✓ A cafeína suprimiu o efeito do exercício físico de natação nos testes de memória de reconhecimento do objeto de longo prazo e de localização de objeto;
- ✓ A administração de cafeína bloqueou o efeito do exercício físico de natação em aumentar os níveis hipocampais fosforilados e ativos da proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB) e da proteína quinase serina/treonina (Akt) em ratos de meia idade;
- ✓ A suplementação com cafeína diminuiu a captação de glutamato em fatias de hipocampus em ratos de meia idade, e o exercício de natação não alterou este parâmetro.

Mais estudos são necessários para elucidar de que forma a suplementação, pré-treino com cafeína, prejudicou a memória de ratos de meia-idade exercitados.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO M, VIANNA MR, DEPINO AM, MELLO E SOUZA T, PEREIRA P, SZAPIRO G, VIOLA H, PITOSI 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.
- BALTES PB, SMITH J (2006) Novas fronteiras para o futuro do envelhecimento: a velhice bem-sucedida do idoso jovem aos dilemas da quarta idade. *A terceira idade* 17:7-31.
- BARNES DE, YAFFE K, SATARIANO WA, TAGER IB (2003) A longitudinal study of cardiorespiratory fitness and cognitive function in healthy older adults. *Journal of the American Geriatrics Society* 51:459-465.
- BARONE JJ, ROBERTS HR (1996) Caffeine consumption. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 34:119-129.
- BAXTER MF, BAXTER DA (2001) Mecanismos neurais do aprendizado e da memória. Editora Manole.
- BENARROCH EE (2008) Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology* 70:231-236.
- BRASTED PJ, BUSSEY TJ, MURRAY EA, WISE SP (2003) Role of the hippocampal system in associative learning beyond the spatial domain. *Brain : a journal of neurology* 126:1202-1223.
- BRUNBECH L, SABERS A (2002) Effect of antiepileptic drugs on cognitive function in individuals with epilepsy: a comparative review of newer versus older agents. *Drugs* 62:593-604.
- BRUNDEGE JM, DUNWIDDIE TV (1996) Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from single hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:5603-5612.
- CAHILL L, MCGAUGH JL (1998) Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in neurosciences* 21:294-299.
- CASANOVA SOTOLONGO P, CASANOVA CARRILLO P, CASANOVA CARRILLO C (2004) [Memory. An introduction to the study of the cognitive disorders in normal and pathological aging]. *Revista de neurologia* 38:469-472.
- CECHELLA JL, LEITE MR, ROSARIO AR, SAMPAIO TB, ZENI G (2014) Diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise enhance novel object recognition memory in old rats. *Age (Dordr)* 36:9666.
- CHEN H, WEBER AJ (2004) Brain-derived neurotrophic factor reduces TrkB protein and mRNA in the normal retina and following optic nerve crush in adult rats. *Brain Res* 1011:99-106.
- CHRISTENSEN H (2001) What cognitive changes can be expected with normal ageing? *The Australian and New Zealand journal of psychiatry* 35:768-775.
- CIVINSKI C, MONTIBELLER A, DE OLIVEIRA AL (2011) A Importância do Exercício Físico no Envelhecimento. *Revista da UNIFEDE-ISSN* 1679-8708 1.
- COTMAN CW, ENGESESSER-CESAR C (2002) Exercise enhances and protects brain function. *Exercise and sport sciences reviews* 30:75-79.
- CROLL SD, IP NY, LINDSAY RM, WIEGAND SJ (1998) Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain research* 812:200-208.
- DE MENDONÇA A, CUNHA RA (2010) Putative neuroprotective effects of caffeine in clinical trials. Concluding remarks. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 20 Suppl 1:S249-252.



- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:2905-2913.
- DRACHMAN DA (1997) Aging and the brain: a new frontier. *Annals of neurology* 42:819-828.
- DRISCOLL I, SUTHERLAND RJ (2005) The aging hippocampus: navigating between rat and human experiments. *Reviews in the neurosciences* 16:87-121.
- DUARTE CP, SANTOS CL, GONÇALVES AK (2002) A concepção de pessoas de meia-idade sobre saúde, envelhecimento e atividade física como motivação para comportamentos ativos. *Revista Brasileira de Ciências do Esporte*.
- EICHENBAUM H (1997) Declarative memory: insights from cognitive neurobiology. *Annual review of psychology* 48:547-572.
- EICHENBAUM H., PAUL E. GOLD, WILLIAM T. GREENOUGH (2002) Memory consolidation: Essays in honor of James L. McGaugh.: *Contemp. Psy.* .
- FISONE G, BORGKVIST A, USIELLO A (2004) Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61:857-872.
- FREDHOLM BB, AP IJ, JACOBSON KA, KLOTZ KN, LINDEN J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological reviews* 53:527-552.
- 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. *Pharmacological reviews* 51:83-133.
- FREDHOLM BB, CHEN JF, CUNHA RA, SVENNINGSSON P, VAUGEOIS JM (2005) Adenosine and brain function. *International Review of Neurobiology*, Vol 63 63:191-270.
- FREDHOLM BB, CUNHA RA, SVENNINGSSON P (2003) Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Current topics in medicinal chemistry* 3:413-426.
- GREENBERG ME, XU B, LU B, HEMPSTEAD BL (2009) New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:12764-12767.
- GUYTON A, HALL JE (1997) *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- HIGDON JV, FREI B (2006) Coffee and health: a review of recent human research. *Critical reviews in food science and nutrition* 46:101-123.
- HOEXTER MQ, ROSA PS, TUFIK S, MELLO LE (2005) Consequences of prolonged caffeine administration and its withdrawal on pilocarpine- and kainate-induced seizures in rats. *Epilepsia* 46:1401-1406.
- IBGE (2010a) *Atlas do Censo Demográfico*.
- IBGE IBDGEE (2010b) *Projeção da população por sexo e idade: Brasil 2000-2060*.
- IZQUIERDO I (1993) LONG-TERM POTENTIATION AND THE MECHANISMS OF MEMORY DRUG DEV RES 30:1-17.
- IZQUIERDO I (2002) *Memória: Artmed*.
- IZQUIERDO I (2011) *Memória*. Porto Alegre: Artmed.
- IZQUIERDO I, MCGAUGH JL (2000) Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol* 11:517-534.
- JACOBSON L, ZHANG R, ELLIFFE D, CHEN KF, MATHAI S, MCCARTHY D, WALDVOGEL H, GUAN J (2008) Correlation of cellular changes and spatial memory during aging in rats. *Experimental gerontology* 43:929-938.
- KIM SE, KO IG, KIM BK, SHIN MS, CHO S, KIM CJ, KIM SH, BAEK SS, LEE EK, JEE YS (2010) Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in

- neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. *Experimental gerontology* 45:357-365.
- KRAMER AF, ERICKSON KI, COLCOMBE SJ (2006) Exercise, cognition, and the aging brain. *J Appl Physiol* 101:1237-1242.
- LACHANCE MP, MARLOWE C, WADDELL WJ (1983) Autoradiographic disposition of [1-methyl-14C]- and [2-14C]caffeine in mice. *Toxicology and applied pharmacology* 71:237-241.
- LEE HH, KIM H, LEE JW, KIM YS, YANG HY, CHANG HK, LEE TH, SHIN MC, LEE MH, SHIN MS, PARK S, BAEK S, KIM CJ (2006) Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain & development* 28:147-154.
- MATSUDO SM, MATSUDO VKR, BARROS NETO TL (2000) Impacto do envelhecimento nas variáveis antropométricas, neuromotoras e metabólicas da aptidão física.
- MCGAUGH JL (2000) Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- MCGAUGH JL (2002) Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends in neurosciences* 25:456.
- MCGAUGH JL, IZQUIERDO I (2000) The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends in pharmacological sciences* 21:208-210.
- MEEUSEN R (2005) Exercise and the brain: insight in new therapeutic modalities. *Ann Transplant* 10:49-51.
- MEIRELLES ME (1997) *Atividade Física na Terceira Idade: uma abordagem sistêmica*. Rio de Janeiro: Sprint.
- NEHLIG A, ARMSPACH JP, NAMER IJ (2010) SPECT assessment of brain activation induced by caffeine: no effect on areas involved in dependence. *Dialogues in clinical neuroscience* 12:255-263.
- NEWSON RS, KEMPS EB (2005) General lifestyle activities as a predictor of current cognition and cognitive change in older adults: a cross-sectional and longitudinal examination. *The journals of gerontology Series B, Psychological sciences and social sciences* 60:P113-120.
- OHIRA K, HAYASHI M (2009) A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. *Current neuropharmacology* 7:276-285.
- PALÁCIOS J, MARCHESI A, COLL C (2004) *Mudança e Desenvolvimento Durante a Idade Adulta e a Velhice*: Artmed.
- PARENTE MAMP (2006) *Cognição e envelhecimento*. Porto Alegre: Artmed.
- PIETRELLI A, LOPEZ-COSTA J, GONI R, BRUSCO A, BASSO N (2012) Aerobic Exercise Prevents Age-Dependent Cognitive Decline and Reduces Anxiety-Related Behaviors in Middle-Aged and Old Rats. *Neuroscience* 202:252-266.
- POLLOCK GS, VERNON E, FORBES ME, YAN Q, MA YT, 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 : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:3923-3931.
- RACHIMA-MAOZ C, PELEG E, ROSENTHAL T (1998) The effect of caffeine on ambulatory blood pressure in hypertensive patients. *American journal of hypertension* 11:1426-1432.
- RAHMAN A (2009) The role of adenosine in Alzheimer's disease. *Current neuropharmacology* 7:207-216.
- RIBEIRO JA, SEBASTIAO AM (2010) Caffeine and Adenosine. *Journal of Alzheimers Disease* 20:S3-S15.

- RIBEIRO JA, SEBASTIAO AM, DE MENDONCA A (2003) Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug news & perspectives* 16:80-86.
- ROSENZWEIG ES, BARNES CA (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in neurobiology* 69:143-179.
- SAKAMOTO K, KARELINA K, OBRIETAN K (2011) CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *Journal of neurochemistry* 116:1-9.
- SANTOS FH, ANDRADE VM, BUENO OFA (2009) Envelhecimento: um processo multifatorial, *Psicologia em Estudo*. The Scientific Electronic Library Online v. 14:3-10.
- SAUMIER D, CHERTKOW H (2002) Semantic memory. *Current neurology and neuroscience reports* 2:516-522.
- SEBASTIAO AM, RIBEIRO JA (2009) Adenosine receptors and the central nervous system. *Handbook of experimental pharmacology* 471-534.
- SIEPMANN M, KIRCH W (2002) Effects of caffeine on topographic quantitative EEG. *Neuropsychobiology* 45:161-166.
- 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 research* 11:1031-1040.
- SILHOL M, BONNICHON V, RAGE F, TAPIA-ARANCIBIA L (2005) Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132:613-624.
- SQUIRE LR, ZOLA SM (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13515-13522.
- SQUIRE RL, KANDEL ER (2003) *Memória: da mente às moléculas*. Porto Alegre: Artmed.
- STONE TW, CERUTI S, ABBRACCHIO MP (2009) Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handbook of experimental pharmacology* 535-587.
- SUZUKI A, FUKUSHIMA H, MUKAWA T, TOYODA H, WU LJ, ZHAO MG, XU H, SHANG Y, ENDOH K, IWAMOTO T, MAMIYA N, OKANO E, HASEGAWA S, MERCALDO V, ZHANG Y, MAEDA R, OHTA M, JOSSELYN SA, ZHUO M, KIDA S (2011) Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:8786-8802.
- SVILAAS A, SAKHI AK, ANDERSEN LF, SVILAAS T, STROM EC, JACOBS DR, OSE L, BLOMHOFF R (2004) Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *Journal of Nutrition* 134:562-567.
- TANAKA H, NAKAZAWA K, ARIMA M, IWASAKI S (1984) Caffeine and its dimethylxanthines and fetal cerebral development in rat. *Brain & development* 6:355-361.
- TAPIA-ARANCIBIA L, ALIAGA E, SILHOL M, ARANCIBIA S (2008) New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain research reviews* 59:201-220.
- 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.
- ULLMAN MT (2004) Contributions of memory circuits to language: the declarative/procedural model. *Cognition* 92:231-270.
- VAN PRAAG H (2009) Exercise and the brain: something to chew on. *Trends in neurosciences* 32:283-290.
- VERNIKOS-DANELIS J, HARRIS CG (1968) The effect of in vitro and in vivo caffeine, theophylline and hydrocortisone on the phosphodiesterase activity of the pituitary, median eminence, heart and cerebral cortex. *Proc Soc Exp Biol Med* 128:1016-1021.

- VIOLA H, FURMAN M, IZQUIERDO LA, ALONSO M, BARROS DM, DE SOUZA MM, IZQUIERDO I, MEDINA JH (2000) Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:RC112.
- VOLTARELLI FA, GOBATTO CA, DE MELLO MAR (2002) Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35:1389-1394.
- VON BOHLEN O, HALBACH O (2010) Involvement of BDNF in age-dependent alterations in the hippocampus. *Front Aging Neurosci* 2.
- WYSE AT, BAVARESCO CS, REIS EA, ZUGNO AI, TAGLIARI B, CALCAGNOTTO T, NETTO CA (2004) Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus. *Physiology & behavior* 80:475-479.
- ZAMBALDI PA, COSTA TABN, DINIZ GCLM, SCALZO PL (2007) The effect of balance training in a group of community-dwelling elderly women: a pilot study of a specific, non-systematic and short-term approach. *ACTA FISIATR* 14:17-24.