

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Ana Claudia Jesse

**EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO TARDIA DA
MEMÓRIA DE MEDO EM RATOS**

Santa Maria, RS
2016

Ana Claudia Jesse

**EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO TARDIA DA MEMÓRIA DE
MEDO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Santa Maria, RS

2016

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

Jesse, Ana Claudia
Efeito da cafeína sobre a consolidação tardia da memória de medo em ratos / Ana Claudia Jesse.- 2016.
51 f.; 30 cm

Orientador: Carlos Fernando de Mello
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2016

1. Cafeína 2. Consolidação Tardia da Memória 3. Condicionamento de Medo ao Contexto 4. Ratos I. Mello , Carlos Fernando de II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Ana Claudia Jesse. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: anaclaudiajesse@gmail.com

Ana Claudia Jesse

**EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO TARDIA DA MEMÓRIA
DE MEDO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

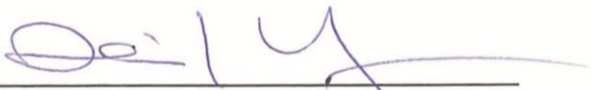
Aprovado em 19 de julho de 2016:



Carlos Fernando de Mello, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Gustavo Petro Guerra, Dr. (UTFPR)



Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Hilda e Fridolino, meu agradecimento pelo apoio e incentivo em todas as etapas. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que alcancei até o presente momento, por todas as portas que me foram abertas, pelas pessoas maravilhosas que Ele tem colocado em meu caminho e também pelos momentos laboriosos, pois estes não serviram de más recordações e sim de aprendizado.

À minha família, minha mãe, Hilda, meu pai, Fridolino, meu irmão, Cristiano e minha cunhada, Silvana, que lutaram junto comigo para concretizar esta etapa, que souberam entender os momentos de ausência, sempre com uma palavra de conforto e motivadora, quero agradecer-lhes do fundo do meu coração, pelo incentivo, fé e amor em mim depositados, também quero que saibam que vocês sempre serão o alicerce na minha vida. Muito obrigada por vocês existirem e me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais de coração e alma, Solaine e Ilo Massierer, pela constante presença e apoio em toda a minha caminhada acadêmica e fora dela! Meu carinho e admiração por vocês são infinitos! Obrigada por tudo!

Às queridas amigas de infância, Thais Raquel Sossmeier e Cátia Larssen, por sempre estarem presentes em minha vida, mesmo distantes, me apoiando e torcendo muito por mim! Amo vocês!

Ao grande mestre e querido Professor Dr. Carlos Fernando de Mello, que acreditou em mim desde a graduação. Prof., muito obrigada pelo ensino, pelas palavras e incentivo.

Às colegas do LabNeuro do prédio 15B, por sempre me auxiliarem em minhas dúvidas e por serem grandes companheiras de trabalho e amigas! Cada uma é muito especial!

Às colegas do LabNeuro do prédio 18 e Prof. Dr. Maribel Antonello Rubin, pela amizade, pelo conhecimento compartilhado e participação nos seminários. Muito obrigada!

Aos colegas do LabNeuro do prédio 21 e ao Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira e Prof. Dr. Ana Flávia Furian, pelo apoio, incentivo e ótima convivência. Vocês são grandes exemplos de pesquisadores. Muito obrigada!

Aos amigos e colegas do BioRep, em especial Werner Glanzner, Vitor Braga Rissi e Lady Katerine Serrano Mujica! Vocês são meus grandes exemplos e inspiradores. Muito obrigada pela amizade, pelos ensinamentos e pela agradabilíssima convivência.

Aos animais utilizados para a realização deste trabalho, todo o meu respeito e gratidão.

À secretária da Pós-graduação em Farmacologia, Zeli de Maria Carvalho, pela disponibilidade e auxílio nos processos burocráticos.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Farmacologia que contribuíram para a minha formação como mestre, meu agradecimento.

À Universidade Federal de Santa Maria, por disponibilizar cursos de pós-graduação de qualidade e por garantir o acesso universal ao conhecimento.

À Capes pela bolsa de estudos.

À todos que de alguma forma contribuíram e participaram da realização deste trabalho. Meu sincero muito obrigada!

RESUMO

EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO TARDIA DA MEMÓRIA DE MEDO EM RATOS

AUTOR: Ana Claudia Jesse

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Cafeína, um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina, é uma das substâncias psicoestimulantes mais consumidas no mundo. Existem relatos contraditórios a respeito do efeito da cafeína sobre a memória e aprendizado. Enquanto alguns estudos sugerem um efeito de melhora pela administração da cafeína em modelos animais de laboratório e humanos, outros relatam que ela não afeta a memória ou mesmo prejudique. No presente estudo, nós investigamos se a administração de cafeína altera a consolidação tardia e a persistência da memória de medo na tarefa de condicionamento ao contexto em ratos. Ratos Wistar machos adultos receberam três choques 1 s - 0,6 mA (separados por 40 s) em uma câmara de condicionamento de medo, e foram injetados com salina (0,9 % NaCl, i.p.) ou cafeína (0,3, 3 ou 30 mg/kg, i.p.) ou espermidina (10 mg/kg, i.p.), 12 horas após o treino. A sessão de teste foi realizada 2, 7 ou 14 dias após o treino e a porcentagem da resposta de *freezing* foi medida. A administração de cafeína (3 mg/kg, i.p.) 12 h após o treino aumentou o *freezing* ao contexto de ratos testados 2 dias após o treino. Nenhuma dose de cafeína foi capaz de alterar o *freezing* ao contexto nas sessões de teste realizadas 7 e 14 dias após o treino. A administração de espermidina (10 mg/kg, i.p.) 12 h após o treino, foi capaz de aumentar o *freezing* ao contexto nas sessões de teste realizadas 2 e 7 dias após o treino. Nossos resultados sugerem que a administração tardia de cafeína facilita a consolidação da memória, mas não a persistência da memória em ratos.

Palavras-chave: Cafeína. Consolidação Tardia da Memória. Condicionamento de Medo ao Contexto. Ratos.

ABSTRACT

EFFECT OF CAFFEINE ON LATE CONSOLIDATION OF FEAR MEMORY IN RATS

AUTHOR: Ana Claudia Jesse

ADVISOR: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Caffeine, an antagonist of adenosine receptors, is one of the most widely consumed psychostimulant substance in the world. There are contradicting reports about the effect of caffeine on learning and memory. While some studies suggest an improving effect of caffeine administration in animal and human models, other reports that caffeine do not affect memory or even impairs. In the present study, we investigated whether caffeine administration alters late memory consolidation and fear memory persistence in contextual conditioning task in rats. Male adult Wistar rats received three 1 s - 0.6 mA footshocks (40 s apart) in a fear conditioning chamber and were injected with saline (0.9 % NaCl, i.p.) or caffeine (0.3, 3 or 30 mg/kg, i.p.) or spermidine (10 mg/kg, i.p.), 12 hours post-training. The testing session was held at 2, 7 or 14 days post-training and the percent of freezing responses was measured. Caffeine administration (3 mg/kg, i.p.) 12 h post-training increased freezing to context of rats tested 2 days after training. Other dose of caffeine were not able to alter freezing to context in the testing session at 7 and 14 days after training. Spermidine administration (10 mg/kg, i.p.) 12 h post-training was able to increase the freezing to context in the testing session carried 2 and 7 days after training. Our findings suggest that late caffeine administration facilitates memory consolidation but not memory persistence in rats.

Keywords: Caffeine. Late Memory Consolidation. Fear Contextual Conditioning. Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1 - | Estrutura molecular da cafeína | 14 |
| Figura 2 - | Receptores de adenosina | 17 |
| Figura 3 - | Fases da formação da memória. Aquisição, consolidação e evocação | 19 |
| Quadro 1 - | Ação da cafeína sobre os receptores para adenosina em humanos | 18 |
| Quadro 2 - | Ação da cafeína sobre os receptores para adenosina em ratos | 18 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 13 |
| 2.1 | CAFÉ..... | 13 |
| 2.2 | CAFEÍNA..... | 14 |
| 2.2.1 | Fontes..... | 14 |
| 2.2.2 | Estrutura e propriedades físico-químicas | 14 |
| 2.2.3 | Farmacocinética | 15 |
| 2.2.4 | Farmacodinâmica..... | 16 |
| 2.3 | MEMÓRIA..... | 19 |
| 2.4 | EFEITOS DA CAFEÍNA SOBRE A MEMÓRIA..... | 20 |
| 3 | OBJETIVOS | 22 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 22 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| 4 | RESULTADOS..... | 23 |
| 4.1 | MANUSCRITO | 23 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 40 |
| 6 | CONCLUSÃO | 42 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 43 |

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada em tópicos, a saber: **Introdução, Revisão Bibliográfica, Objetivos, Resultados** (Manuscrito), **Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas**. No manuscrito são apresentadas as seções Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências.

Em relação aos tópicos da dissertação, a Introdução apresenta o embasamento teórico que permitiu a formulação da proposta do trabalho. Os objetivos (geral e específicos) estão dispostos no corpo do trabalho. E a seção Resultados contém o manuscrito que está sob avaliação pela revista **Psychopharmacology**. Nos tópicos, Discussão e Conclusão, presentes na dissertação, é apresentada uma abordagem geral do trabalho realizado. Por fim, as Referências Bibliográficas referem-se apenas às citações dos itens Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

O café é a principal fonte de cafeína, sendo consumido por populações mundiais pelo seu efeito estimulante, nos mais variados contextos culturais. Desde a antiguidade sabe-se dos efeitos psicoestimulantes que o café provoca naqueles que o consomem, incluindo o famoso mito de Kaldi e suas cabras dançantes (Bennett & Bonnie, 2002), considerado o primeiro relato do efeito estimulante do café. Dentro do gênero *Coffea*, *Coffea arabica* (arabica) e *Coffea canephora* (robusta) são as espécies mais aceitas comercialmente, e responsáveis por 99 % do café consumido mundialmente (Mejia & Ramirez-Mares, 2014). De fato, a cafeína é uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo (Nehlig, 1999). Sua ação no sistema nervoso central (SNC) parece ser primariamente devido ao antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina do subtipo A₁ e A_{2A} (Fredholm et al., 1999; Jang et al., 2013). Quanto aos efeitos positivos da cafeína sobre o aprendizado e memória, existem estudos contraditórios em relação a essa propriedade da cafeína em diferentes tarefas comportamentais. Enquanto alguns estudos relatam uma melhora do aprendizado e da memória provocada pela administração de cafeína (Angelucci et al., 2002; Costa et al., 2008; Cunha & Agostinho, 2010; Glade, 2010; Kopf et al., 1999; Prediger et al., 2005a, b, c, d), outros relatam que ela prejudica (Corodimas et al., 2000; Sanday et al., 2013) ou não afeta a memória (Furusawa, 1991; Hudzik & Wegner, 1993; Smith et al., 1994). Estes resultados controversos podem ser devido ao período em que a cafeína é administrada, pelo uso de diferentes tarefas comportamentais, entre outros fatores metodológicos.

A formação da memória é um processo que necessita inicialmente de um aprendizado, ou seja, a aquisição de uma nova informação. Após esse processo, ocorre uma série de alterações moleculares e celulares no cérebro, como síntese de novas proteínas, que levam a uma estabilização progressiva da memória (McGaugh et al., 2000). Esse processo, que se inicia imediatamente após o aprendizado e é tempo-dependente, é chamado de consolidação (Dudai, 2004; McGaugh et al., 2000). Durante a consolidação, a memória é lábil e suscetível a intervenções, incluindo modulação por agentes farmacológicos. Após a consolidação, a memória fica disponível para ser recuperada ou evocada, quando necessário (Izquierdo, 2002).

Estudos recentes têm mostrado resultados controversos quanto ao efeito da cafeína sobre a memória. Borota e colaboradores, em 2014, mostram que a cafeína administrada imediatamente após o aprendizado melhora a memória em humanos, sugerindo que a cafeína pode facilitar a consolidação da memória. Em modelos animais de laboratório também

observa-se o efeito positivo da cafeína sobre a memória quando administrada imediatamente após o treino (Angelucci et al., 1999; Kopf et al., 1999). Por outro lado, vários estudos mostram que a cafeína piora a memória quando administrada antes da aquisição (durante o aprendizado da tarefa) (Angelucci et al., 1999; Sanday et al., 2013). Contudo, nenhum estudo investigou, até o momento, o efeito da cafeína sobre a consolidação tardia da memória e sua persistência. Portanto, neste estudo investigamos se a administração de cafeína, 12 horas após o treino, altera a consolidação tardia da memória de medo condicionado ao contexto e a sua persistência em ratos testados em 2, 7 ou 14 dias após o treino.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CAFÉ

Conforme descrito no livro “The World of Caffeine: The Science and Culture of the World's Most Popular Drug”, o primeiro relato do consumo de café ocorreu por volta da metade do século 15 na Etiópia, e posteriormente difundiu-se do Iêmen e dos Países Árabes para o resto do mundo. O mito de Kaldi e suas cabras dançantes relata a primeira vez em que o café foi consumido, primeiramente pelas cabras e, posteriormente, pelo camponês etíope, após infundir em água quente os grãos de café, que foram queimados em uma fogueira no monastério por serem considerados satânicos. Desta forma teria sido feita a primeira infusão de café do mundo, conforme relatado por Antoine Faustus Nairon, em 1671. Infelizmente, para quem acredita que Kaldi possa ter sido uma pessoa real, este conto não aparece em quaisquer fontes árabes e, portanto, supõe-se ter sido originado da imaginação literária de Nairon e se espalhou por causa de seu apelo aos primeiros bebedores de café europeus (Bennett & Bonnie, 2002).

O café é uma mistura química complexa, consistindo de aproximadamente 1.000 compostos bioativos, chamados fitoquímicos, responsáveis pelo seu sabor e aroma (Mejia & Ramirez-Mares, 2014). Entre estes compostos estão as metilxantinas (cafeína, teobromina, teofilina), álcoois diterpenos (cafestol, *kahweol*), flavonoides (catequinas, antocianinas), entre outros (Rodrigues and Bragagnolo, 2013). O café é a principal fonte de cafeína, sendo colhido de árvores do gênero *Coffea*, originárias da Etiópia, onde hoje ainda fazem parte da vegetação natural, tendo 103 espécies identificadas. Contudo, apenas duas, as mais aceitas comercialmente, *Coffea arabica* (arabica) e *Coffea canephora* (robusta) são responsáveis por aproximadamente 99 % do café consumido mundialmente (Mejia & Ramirez-Mares, 2014). Na Europa, o café começou a ser consumido por volta do século XVI, ainda de forma muito restrita, pois o chá era a bebida dos nobres. A partir do século XVII o café encontrou melhor aceitação, passando a ser consumido em vários estabelecimentos públicos, quando também começou a ser considerado uma bebida de intelectuais. O café chegou ao Brasil por volta de 1727, primeiramente na cidade de Belém, trazido da Guiana Francesa pelo Sargento Francisco de Mello Palheta, a pedido do governador do Maranhão, que o enviara às Guianas com essa missão (ABIC, 2016; Neves, 1974). As condições climáticas muito favoráveis para o cultivo do café no Brasil fez com que a cultura se espalhasse por todo o território nacional,

principalmente Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (ABIC, 2016; Neves, 1974).

Atualmente, o café é a substância estimulante mais consumida no mundo (Fredholm et al., 1999). Dados da Organização Internacional do Café mostram que o consumo mundial de café ultrapassa 150 milhões de sacas por ano, mantendo crescimento anual significativo de 2,5 %. O Brasil é o segundo maior consumidor de café do mundo, atrás apenas dos EUA, que consome anualmente 24 milhões de sacas de café (OIC, 2015).

2.2 CAFEÍNA

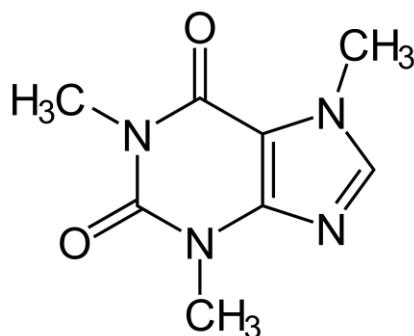
2.2.1 Fontes

A cafeína é encontrada em mais de 60 espécies de plantas distribuídas mundialmente, incluindo o café, chá, guaraná, erva mate e o cacau como fontes mais conhecidas. Sua concentração varia de acordo com o tipo de produto, prática agrícola, fatores ambientais, processamento e armazenamento. O café é a principal fonte de cafeína na dieta de adultos, sendo consumido por inúmeros americanos que bebem diariamente mais de 400 milhões de copos de café (Mejia & Ramirez-Mares, 2014; NCA, 2012).

2.2.2 Estrutura e propriedades físico-químicas

A cafeína é uma trimetilxantina, ou xantina trimetilada, sendo classificada como um alcalóide de ocorrência natural, possuindo como fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$ e peso molecular de 194,19 g/mol. A cafeína tem vários sinônimos, sendo o mais usual deles 1,3,7-trimetilxantina. Sua estrutura molecular encontra-se na figura abaixo (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura molecular da cafeína



À temperatura ambiente a cafeína é inodora, tem gosto amargo e se apresenta como um pó branco opaco. Essa metilxantina apresenta solubilidade moderada em água à temperatura ambiente (21,6 g/l a 25 °C), mas é bastante solúvel em água quente (181 g/l a 80 °C) (PubChem).

2.2.3 Farmacocinética

Por ser uma molécula lipofílica, a cafeína passa facilmente através de membranas, o que ocasiona uma rápida e completa absorção no estômago e intestino, e atinge a corrente sanguínea, que a distribui para todo o organismo. No período pós-absortivo, a cafeína chega ao SNC após atravessar a barreira hematoencefálica, provocando seu conhecido efeito psicoestimulante (Fredholm et al., 2005).

A absorção da cafeína pelo trato gastrointestinal é rápida, em torno de 30-45 min após a ingestão, e chega a 99 % em humanos (Arnaud, 1993; Bonati et al., 1982; Marks & Kelly, 1973) e também em roedores (Arnaud, 1976, 1985). A meia vida da cafeína é de 3-4 horas em adultos saudáveis e, em ratos, cerca de 1 hora (Morgan et al., 1982). A cafeína é metabolizada principalmente pelas enzimas do citocromo P450 do fígado, especificamente a CYP1A2, transformando a cafeína em dimetilxantinas como a paraxantina (1,7-dimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e teofilina (1,3-dimetilxantina), que apresentam atividade no organismo e são eliminadas na urina após sofrerem metabolização pelo fígado. A excreção da cafeína é predominantemente renal (Arnaud, 1976).

A cafeína, como outras metilxantinas, apresenta estrutura semelhante aos nucleotídeos cíclicos e, portanto, a capacidade de atuar como inibidor das fosfodiesterases. Porém, a afinidade da cafeína e de outras metilxantinas pelas fosfodiesterases é baixa, sendo necessário altas concentrações (na faixa de milimolar-mM) para ter efeito significativo (Cardinali, 1980; Francis et al., 2010). A constante de afinidade da cafeína pela fosfodiesterase é na ordem de 250-1000 μM (Aronsen et al., 2014).

O efeito mais conhecido e desejado da cafeína é como estimulante do SNC, o qual é a base para a popularidade de todas as bebidas que contém cafeína (Ferré, 2008). Além disso, a ingestão de cafeína está associada com o aumento do estado de alerta, melhora da atenção, desempenho psicomotor e cognitivo (Ferré, 2008; Smith et al., 2005; Takahashi et al., 2008). Entre todas as metilxantinas, a cafeína é o estimulante mais potente do SNC, tendo sua ação inicial no córtex, passando para o bulbo e finalmente para a medula espinhal (Fredholm et al., 1999).

A cafeína também é considerada termogênica, provocando um leve aumento da taxa metabólica. De fato, tem sido relatado que a ingestão de 50 mg de cafeína pode aumentar a taxa metabólica basal em 6 %. As mudanças máximas ocorrem em até 4 horas após a administração dessa substância, estimulando a lipólise, glicogenólise e gliconeogênese (Belza et al., 2009).

Estudos farmacológicos e epidemiológicos também relatam que o consumo habitual de café tem inúmeros efeitos benéficos para a saúde, incluindo menor risco para a doença de Alzheimer (Arendash et al., 2006; Dall'Igna et al., 2003, 2007; Ritchie et al., 2007) e doença de Parkinson (Chen et al., 2008, 2001), efeito favorável sobre o funcionamento hepático, risco diminuído para certos tipos de câncer (endometrial e hepático, por exemplo) (Cano-Marquina et al., 2013; O'Keefe et al., 2013) e para desenvolver diabetes do tipo 2 (Bhupathiraju et al., 2013). Contudo, o consumo de café tem sido associado à menor densidade óssea e consequente aumento de fraturas, bem como ao aumento da pressão arterial (Glade, 2010). O consumo excessivo de café tem sido associado à cefaleia, ansiedade, insônia e náuseas (Mejia & Ramirez-Mares, 2014). A quantidade de cafeína necessária para provocar os efeitos adversos varia individualmente, dependendo do peso, idade, sexo e suscetibilidade (Mejia & Ramirez-Mares, 2014).

A interrupção do consumo crônico de cafeína em humanos manifesta-se tipicamente por sintomas de síndrome de retirada (“abstinência”) como dor de cabeça, irritabilidade, dificuldade de concentração, ansiedade, entre outros (Daly et al., 1998; Juliano et al., 2004; Shapiro, 2007). Os sintomas de retirada começam lentamente e têm seu pico em até 2 dias, e desaparecem quando o consumo de café é retomado (Daly et al., 1998).

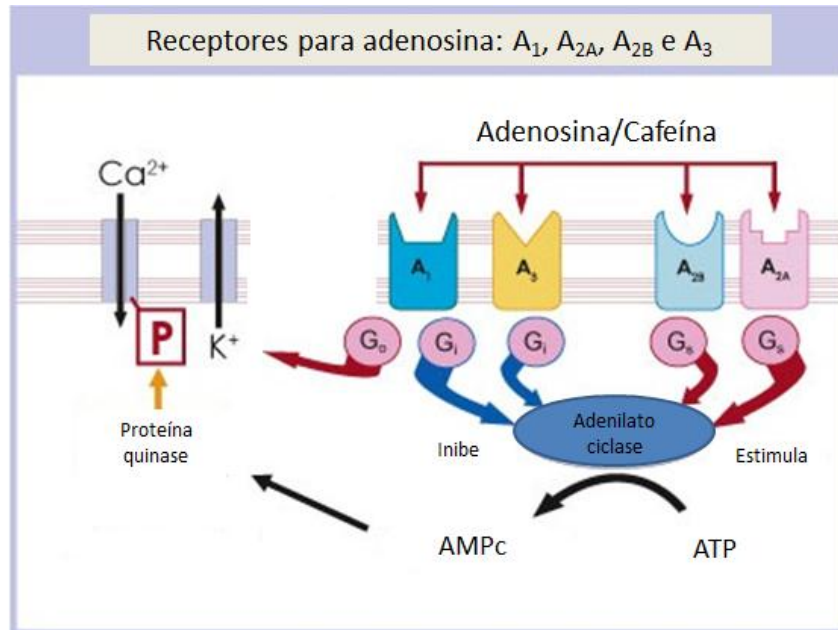
Em humanos, a dose oral letal de cafeína é estimada em torno de 10 g, sendo que a concentração sanguínea alcança até 500 mM (Dews, 1982). Em animais, doses muito altas, próximas da dose letal de cafeína, podem produzir crises tônico-clônicas, devido ao seu efeito estimulante central em ratos (Chu, 1981) e camundongos (Marangos et al., 1981).

2.2.4 Farmacodinâmica

A cafeína exerce seus efeitos psicoestimulantes no SNC através do bloqueio não seletivo dos receptores de adenosina do subtipo A_1 e A_{2A} , sendo considerado os alvos farmacológicos preferenciais da cafeína (Ferré, 2008; Fredholm et al., 1999). Os receptores para adenosina são farmacologicamente identificados em A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , todos acoplados à proteína G, seja G_s ou G_i . Os receptores A_1 e A_3 estão acoplados à proteína G_i , inibitória,

enquanto os receptores A_{2A} e A_{2B} estão acoplados à proteína Gs, excitatória (Fredholm et al., 2001) (Figura 2).

Figura 2 - Receptores de adenosina



Fonte: Ham & Evans, 2012

Os receptores para adenosina do subtipo A_1 são amplamente expressos no sistema nervoso central, incluindo córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, tálamo, entre outros, enquanto os receptores do subtipo A_{2A} estão concentrados no estriado (Ferré, 2008; Karcz-Kubicha et al., 2003). Os receptores A_1 e A_{2A} também são expressos em células gliais e contribuem para a melhora da plasticidade sináptica, por aumentar a captação de glutamato e a liberação de ATP e adenosina dos astrócitos (Boison, Chen & Fredholm, 2010). Pouco se sabe a respeito do papel dos receptores A_{2B} e A_3 na modulação da memória e aprendizado, principalmente devido à baixa expressão desses receptores no cérebro (Chen, 2014) e menor afinidade da cafeína pelos receptores A_3 (Borrmann et al., 2009; Jacobson et al., 1999).

Apesar da cafeína ser considerada um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina, o receptor preferencial para a cafeína desencadear seu efeito psicoestimulante ainda é controverso (Ferré, 2008). Estudos mostram que a cafeína pode atuar como um antagonista não seletivo A_1 e A_{2A} (Ferré, 2008; Fredholm et al., 1999) ou pode atuar mais especificamente sobre o receptor A_{2A} (Canas et al., 2009; Cunha & Agostinho, 2010). Porém, levando em conta as constantes de afinidade (K_i) da cafeína pelos receptores para adenosina do subtipo A_1 e A_{2A} , em humanos (Quadro 1) e em ratos (Quadro 2), o receptor preferencial para ação da cafeína é incerto. Estudo realizado por Spealman em 1988 mostrou que o

bloqueio do receptor A_{2A} é o principal responsável pelo aumento da atividade locomotora desencadeada pela administração de cafeína. Outros estudos também mostraram que antagonistas do receptor A_{2A} desencadeiam efeitos comportamentais e bioquímicos semelhantes aos efeitos da cafeína (Svenningsson et al., 1977; El Yacoubi et al., 2000). Em modelos experimentais de doença de Parkinson, os efeitos benéficos da cafeína são mimetizados pelo bloqueio dos receptores para adenosina A_{2A} , reforçando a hipótese de que este receptor está envolvido nos efeitos benéficos provocados pela cafeína (Cunha, 2005; Gomes et al., 2011). A cafeína apresenta diferentes constantes de afinidade para cada receptor de adenosina em humanos (Quadro 1) e ratos (Quadro 2).

Quadro 1 - Ação da cafeína sobre os receptores para adenosina em humanos

| Alvo | Ação | Afinidade (pK _i) | Constante de afinidade (K _i) | Referência |
|--------------------------|-------------|------------------------------|---|-------------------------|
| Receptor A ₁ | Antagonista | 4,3-5,0 | 4,49x10 ⁻⁵ - 1,07x10 ⁻⁵ M | Deckert et al., 1993 |
| Receptor A _{2A} | Antagonista | 4,6-5,6 | - | Kull et al., 1999 |
| Receptor A _{2B} | Antagonista | 4,5-5,0 | 3,38x10 ⁻⁵ - 1,04x10 ⁻⁵ M | Bertarelli et al., 2006 |
| Receptor A ₃ | Antagonista | 4,9 | 1,33x10 ⁻⁵ M | Jacobson et al., 1999 |

Fonte: Iuphar Database

Quadro 2 - Ação da cafeína sobre os receptores para adenosina em ratos

| Alvo | Ação | Afinidade (pK _i) | Constante de afinidade (K _i) | Referência |
|--------------------------|-------------|------------------------------|--|-----------------------|
| Receptor A ₁ | Antagonista | 4,4 | 4,4x10 ⁻⁵ - 4,1x10 ⁻⁵ M | Daly et al., 1991 |
| Receptor A _{2A} | Antagonista | 4,3-4,5 | 4,8x10 ⁻⁵ - 3,25x10 ⁻⁵ M | Jacobson et al., 1999 |
| Receptor A _{2B} | Antagonista | 4,5 | 3x10 ⁻⁵ M | Brackett et al., 1994 |
| Receptor A ₃ | Antagonista | < 4,0 | 1x10 ⁻⁴ M | Borrmann et al., 2009 |

Fonte: Iuphar Database

O bloqueio dos receptores de adenosina pela administração de cafeína pode levar a efeitos secundários importantes sobre o sistema colinérgico (Acquas et al., 2002), sobre o metabolismo da serotonina e das catecolaminas (Abrams et al., 2005; Khaliq et al., 2012; Li et al., 2012), sobre o sistema glutamatérgico (Quiroz et al., 2006), gabaérgico, via GABA_A (Mukhopadhyay & Poddar, 1995) e dopaminérgico (Ferré, 2010; Ferré et al., 2009).

O sistema dopaminérgico parece ser essencial para os efeitos psicoestimulantes da cafeína, pois sabe-se que antagonistas adenosinérgicos modulam a atividade dos receptores dopaminérgicos (Cunha, 2005; Ferré et al., 1992) devido a possibilidade de heterodimerização entre ambos os receptores, exclusivamente A₁/D₁ e A_{2A}/D₂. Os receptores A₁ e A_{2A}, em particular, podem heterodimerizar com os receptores de dopamina D₁ e D₂ (Fuxe et al., 2007; Kim & Palmiter, 2008; Kudlacek et al., 2003) e receptores metabotrópicos glutamatérgicos do grupo 1 e grupo 2 (Di Lorio et al., 1996; Ferré et al., 1999).

2.3 MEMÓRIA

A memória é o processo de aquisição, formação ou consolidação e evocação de informações adquiridas (Izquierdo, 2011; Izquierdo, 2002). Para a formação de uma memória é necessário que ocorra um aprendizado, e estas novas informações podem, ou não, ser armazenadas de forma permanente para serem recuperadas ou evocadas quando necessário (Baddley & Navarro, 1999; Izquierdo, 2002) (Figura 3).

Figura 3 - Fases da formação da memória. Aquisição, consolidação e evocação



Fonte: Quillfeldt, 2006

As memórias podem ser classificadas levando em conta diferentes critérios, como: função, conteúdo, duração, natureza ou motivação (Quillfeldt, 2006). As classificações mais usadas são, por exemplo: de acordo com o seu conteúdo, na qual a memória pode ser classificada em: memória declarativa (explícita) e memória não declarativa (implícita). A memória declarativa é aquela associada a eventos e conhecimentos, aquela que conseguimos verbalizar e é evocada pelo consciente. A memória não declarativa é aquela evocada pelo

inconsciente e que não conseguimos verbalizar, manifestada por meio de comportamentos motores ou sensoriais (Bear et al., 2008; Izquierdo, 2002; Müller & Shumann, 2011; Stickgold, 2005), de acordo com o seu tempo de duração, ou seja, o tempo que fica disponível para a evocação depois de adquirida, em: memória de trabalho (as informações que estão disponíveis por períodos muito curtos de tempo, de segundos a minutos); memória de curta duração (que dura de minutos a poucas horas após ser adquirida); e, memória de longa duração (que pode durar dias, meses ou anos) (Squire et al., 2004), que necessita de uma progressiva estabilização, também chamada de consolidação, para se tornar uma memória de longa duração (Dudai, 2004; McGaugh et al., 2000; Nadel et al., 2012). A memória de longa duração apresenta como característica a persistência ao longo tempo. A formação destas memórias, segundo alguns autores, dependem de uma consolidação precoce que ocorre em torno de 6 horas após o treino, e inclui ativação da expressão gênica, síntese proteica e formação de novas sinapses (Alberini & Kandel, 2014; Bekinschtein et al., 2007; Izquierdo, 2004). Contudo, outros estudos sugerem que a persistência da memória de longa duração depende de síntese proteica que ocorre em torno de 12 horas após a aquisição, na qual ocorre ativação de receptores do tipo NMDA na área tegmental ventral (VTA) seguida da ativação de receptores dopaminérgicos no hipocampo (Rossato et al., 2009) e aumento da expressão do BDNF na área CA1 do hipocampo (Bekinschtein et al., 2008). Portanto, existem duas janelas temporais importantes no processo de consolidação da memória que leva à persistência da memória de longa duração.

De acordo com a sequência de eventos necessários para a formação de uma memória, qualquer intervenção experimental que tem consequências sobre o processamento da memória, depende do momento em que é aplicada. Intervenções farmacológicas realizadas pré-treino afetam tanto a aquisição como a consolidação, além do estado motivacional do animal submetido à determinada tarefa. Contudo, se a intervenção for feita após o treino a consolidação pode ser afetada, sendo que diferentes tempos após o treino podem ter acesso a diferentes estágios dos processos neuroquímicos/fisiológicos envolvidos na consolidação. E, finalmente, se a intervenção for realizada pré-teste, a mesma afeta evocação da memória adquirida e consolidada e também a motivação do animal (Quillfeldt, 2006).

2.4 EFEITOS DA CAFEÍNA SOBRE A MEMÓRIA

Há vários estudos contraditórios a respeito do efeito da cafeína sobre a memória. Enquanto alguns estudos mostram que a cafeína melhora a memória tanto em animais (Botton

et al., 2010; Costa et al., 2008; Prediger et al., 2005a, b, c, d) como humanos (Haskell et al., 2008; Lieberman et al., 2002; Riedel et al., 1995; Borota et al., 2014), outros relatam que ela não interfere ou ainda prejudique a memória (Corodimas et al., 2000; Furusawa, 1991; Hudzik & Wegner, 1993; Sanday et al., 2013; Smith et al., 1994).

A divergência de efeitos da cafeína sobre a memória, pode ser devida, em grande parte, pelo uso de diferentes tarefas e modelos comportamentais, regime de administração (agudo ou crônico), período de administração (pré-treino, pós-treino ou pré-teste), dose, espécie e idade dos animais usados em cada estudo (Angelucci et al., 1999). Evidências farmacológicas sugerem que a administração de cafeína pré-treino prejudica a memória em animais (Angelucci et al., 1999; Dubroqua et al., 2015; Sanday et al., 2013). Por outro lado, há estudos que mostram que quando a cafeína é administrada imediatamente após o treino ocorre uma melhora da memória em animais (Angelucci et al., 1999, 2002; Botton et al., 2010; Cestari et al., 1996; Costa et al., 2008; Kopf et al., 1999; Yonkov, 1984) em diferentes tarefas comportamentais, como condicionamento de medo ao contexto (Corodimas et al., 2000; Dubroqua et al., 2015; Poole et al., 2016;), esquiva inibitória (Angelucci et al., 1999; Dall'Olio et al., 1978; Sanday et al., 2013), reconhecimento de objeto (Botton et al., 2010; Costa et al., 2008), labirinto aquático de Morris (Angelucci et al., 2002) e esquiva ativa (Bakshi et al., 1995; Yonkov, 1984).

Além do efeito de melhora da memória, provocada pela administração de cafeína, outros estudos mostram que a consumo de cafeína crônico previne os déficits cognitivos e a neurodegeneração em modelos de doença de Alzheimer em humanos (Lindsay et al., 2002; Gelber et al., 2011; Maia & de Mendonça, 2002; Ritchie et al., 2007) e animais (Arendash et al., 2006), e doença de Parkinson (Dall'Igna et al., 2003; Gevaerd et al., 2001). Além disso, a administração de cafeína pode diminuir o risco para a doença de Parkinson (Ascherio et al., 2001). Outro estudo epidemiológico mostra também a prevenção da morte neuronal induzida pela administração do peptídeo beta amiloide (A β) (Arendash et al., 2006; Dall'Igna et al., 2003). Portanto, evidências genéticas, farmacológicas e epidemiológicas sugerem uma relação inversa entre o consumo de café e a doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Contudo, com base nos estudos realizados até o presente momento pouco se sabe sobre o efeito agudo da cafeína sobre a consolidação tardia da memória e sua persistência, o que motivou o presente estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da cafeína sobre a consolidação tardia e persistência da memória de medo contextual em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da cafeína administrada 12 horas após o treino sobre a consolidação tardia da memória de medo.
- Verificar o efeito da cafeína administrada 12 horas após o treino sobre a persistência da memória de medo.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos na presente Dissertação estão apresentados sob a forma de Artigo Científico (Manuscrito), composto pelas seguintes seções: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. O manuscrito está sob avaliação pela revista **Psychopharmacology**.

4.1 MANUSCRITO

DELAYED CAFFEINE IMPROVES MEMORY CONSOLIDATION BUT NOT PERSISTENCE IN RATS

Ana Claudia Jesse^a and Carlos Fernando Mello^{a,*}

^aGraduation Program in Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

*Corresponding author. Fax: + 55 55 3220 8870

E-mail address: cf.mello@smail.ufsm.br (C. F. Mello)

mello.cf@gmail.com (alternative)

Acknowledgments: This study was supported by CAPES and CNPq, Brazil. C. F. M. is the recipient of a CNPq productivity fellowship. A. C. J. is the recipient of a CAPES fellowship. All the experiments comply with the current laws of Brazil.

Funding: This study was funded by CAPES and CNPq (grant number 307812/2014-6).

Conflict of Interest: A. C. J. and C. F. M. declare that they have no conflict of interest.

Abstract

Rationale Caffeine, an antagonist at the adenosine receptors, is the most widely used psychoactive substance in the world, and it is generally believed to improve learning and memory. However, such a memory improving effect seems to depend on the dose used the timing of caffeine administration. While caffeine seems to improve early consolidation of memory, no study has examined whether the delayed post-training injection of caffeine alters memory consolidation and memory persistence in rats.

Objective The aim of this study was to investigate the effect of caffeine on late memory consolidation and memory persistence of contextual fear conditioning in rats.

Methods Male adult Wistar rats received three 1 s - 0.6 mA footshocks (40 s apart) in a fear conditioning chamber and were injected with saline (0.9 % NaCl, i.p.) or caffeine (0.3, 3 or 30 mg/kg, i.p.) or spermidine (10 mg/kg, i.p.) 12 h post-training. The testing session was held at 2, 7 or 14 days post-training and the percent of freezing responses was measured.

Results Caffeine (3 mg/kg, i.p., 12 h post-training) increased the percent freezing of rats tested 2 days after training, but had no effect if the testing session was carried 7 or 14 days post-training. Spermidine (10 mg/kg, i.p., 12 h post-training) increased the percent freezing of rats tested 2 and 7 days post-training.

Conclusion Our findings suggest that late caffeine administration facilitates memory consolidation but not memory persistence in rats.

Keywords Caffeine, Late Memory Consolidation, Fear Conditioning, Memory Persistence, Rat

Introduction

Caffeine, the most widely used psychoactive substance in the world (Nehlig 1999), seems to cause its behavioral effects, including on learning and memory, by antagonizing A₁ and A_{2A} adenosine receptors (Fredholm et al. 2005; Jang et al. 2013). However, caffeine actions on other molecular targets have also been proposed to mediate the behavioral effects of this compound such as phosphodiesterase inhibition, sensitization of ryanodine-sensitive channels, and antagonism of GABA_A receptor activity (Daly 2007; Nehlig et al. 1992; Porciúncula et al. 2013; Stone et al. 2009).

Although several lines of evidence support anxiogenic and pro-arousal roles for caffeine (Huang et al. 2005; Lader and Bruce 1986; Lister 1987; Nardi et al. 2009), there are contradicting reports regarding the effect of this methylxanthine on learning and memory in experimental animals, since both learning and memory improvement and impairment, and no effect as well, have been reported.

The contradicting effects of caffeine on learning and memory may be due to methodological issues that include dose, time window of administration and regimen (chronic or acute), task, age and species used to assess it (Angelucci et al. 1999). A closer examination of the studies that have investigated the effect of caffeine on shock-motivated tasks (Table 1), particularly on inhibitory avoidance and fear conditioning, reveals that five out of six independent studies showed that pre-training administration of caffeine (10-100 mg/kg) impairs the performance of mice and rats in these tasks (Angelucci et al. 1999; Corodimas et al. 2000; Dubroqua et al. 2015; Sanday et al. 2013; Zarrindast and Shafaghi 1994). The study that found a facilitatory effect of pre-training caffeine on inhibitory avoidance performance used rats (Prediger et al. 2008) and this fact may have contributed for their findings. In addition, the two studies that have investigated the effect of pre-training caffeine on the performance of mice and rats (1 and 10 mg/kg) in the two-way avoidance task also revealed a significant deleterious effect of the methylxanthine (Gevaerd et al. 2001; Sansone et al. 1994). It is worth pointing out that when an animal is given a treatment before being trained in a memory task, any resulting alteration in behavioral performance at test might be due to the treatment's effects on sensory and motor functioning in place of or in addition to effects on learning and memory (Jensen & Smith 1982; McGaugh 2015; Roesler and McGaugh 2010). Therefore, since in all these studies caffeine was injected before training, one might question whether they really affected learning/memory (acquisition or early consolidation), motivation (drive), anxiety or sensory/motor functioning, instead. The same applies to the studies that

have investigated the effect of caffeine on memory retrieval, for which impairment (Dubroqua et al. 2015), improvement (Angelucci et al. 1999) and no effect (Sanday et al. 2013) of caffeine have been reported. Therefore, though current experimental evidence suggests that pre-training caffeine impairs the acquisition of shock-motivated tasks, due to the methodological issues pointed out by McGaugh and colleagues and the known anxyogenic effect of caffeine in the dose range of 10-60 mg/kg (Balwin et al. 1989; Bhattacharya et al. 1997; Graeff et al. 1998; Lister 1987), it is difficult to ascertain whether caffeine has a specific effect on the acquisition and memory retrieval in mice and rats. On the other hand, a large body of evidence indicates that post-training caffeine improves the early steps of memory consolidation of shock-motivated tasks in both mice and rats (Table 1). Accordingly, four studies have shown that caffeine administration immediately post-training improves memory consolidation (Angelucci et al. 1999; Cestari et al. 1996; Kopf et al. 1999; Yonkov 1984). Interestingly, the only experiment that showed no effect of caffeine on memory consolidation used a protocol of late administration (180 min after training) of the compound (Kopf et al. 1999). Therefore, the timing of caffeine administration seems to be a determinant of the effect of caffeine on the performance of the animals in these tasks.

A number of studies carried out in the last decade have shown that late administration of drugs (around 12 hours post-training) alters memory persistence (Bethus et al. 2010; Izquierdo et al. 2008; Parfitt et al. 2012; Porto et al. 2015; Rossato et al. 2009; Slipczuk et al. 2013; Signor et al. 2014). Accordingly, Rossato and colleagues (2009) have shown that D1 receptor and cAMP/PKA/CREB signaling pathway activation facilitate memory persistence, as suggested by the facilitatory effect of the 12 h post-training administration of SKF38393 and 8-Br-cAMP. Considering that caffeine increases cAMP levels by different mechanisms (Beavo et al. 1990; Butcher et al. 1962; Fredholm et al. 1999; Stefanovich 1979; Svenningsson et al. 2005; Yoshimura 2005) one might reason that caffeine could improve memory persistence if injected 12 hours after training. In fact, no study has addressed whether late caffeine injection (more than three hours after training) alters memory. Therefore, in this study we investigated whether caffeine administration 12 h post-training alters late memory consolidation and memory persistence of the fear contextual conditioning task in rats tested 2, 7 or 14 days post-training.

Materials and Methods

Animals Male adult Wistar rats (180-220 g) from the Animal House of the Federal University of Santa Maria were used. The animals were housed four to a cage and maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 A.M.) at a temperature of 21 °C with water and standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil) *ad libitum*. All experimental procedures were conducted in accordance with the policies on the use of animals and humans in neuroscience research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research in January 1995 and with the institutional and national regulations for animal research (process 8322180216).

Drugs Animals were injected with saline (0.9 % NaCl), anhydrous caffeine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or N-(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine trihydrochloride (spermidine; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). All drugs solution were prepared before each experiment in saline and injections were performed intraperitoneally (i.p.) in a 1 ml/kg injection volume.

Apparatus Fear conditioning was conducted in a conditioning chamber (30 x 25 x 25 cm) located in a well-lit room. The front and ceiling walls of the chamber were made of clear acrylic plastic, whereas the lateral and rear walls were made of opaque plastic. The floor of the chamber consisted of 32 stainless steel rods (3 mm diameter), spaced 1 cm apart and connected to a shock generator. The chamber was cleaned and dried before each rat occupied it with a 30 % ethanol solution to minimize olfactory cues.

Experimental protocol In the fear conditioning training session, the animals were placed in the conditioning chamber (conditioned stimulus, CS) and after a 3 min adaptation period, received three footshocks (0.6 mA and 1 s each one) (unconditioned stimulus, US) that were 40 s apart. After the last CS / US pairing, rats were allowed to stay in the chamber for 60 s to observe the immediate freezing by instantaneous observations every 4 s before returning to their home cages. Twelve hours post-training animals were injected with saline (0.9 % NaCl, i.p.), caffeine (0.3, 3 or 30 mg/kg, i.p.) or spermidine (10 mg/kg, i.p., used as a positive control; Signor et al. 2014). Testing session was held at 2, 7 or 14 days post-training. Animals were tested only once. On the test day no electric shock was applied. Freezing, defined as the absence of all movement except respiration was measured for 8 min by instantaneous

observations every 4 s. The percentage of observations scored as freezing was then calculated and taken as a contextual fear conditioning measure.

Statistical analysis Freezing scores were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's *post hoc* test, when appropriate. Partitioning the total sum of squares into trend components (linear, quadratic and cubic) was used to assess the best fit for the dose-effect curve of caffeine. Data were subjected to arcsin transformation before analysis in order to meet the assumptions for ANOVA. A $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Fig. 1, Fig. 2 and Fig. 3 show the effect of caffeine (0.3, 3 or 30 mg/kg, i.p.) and spermidine (10 mg/kg, i.p.) 12 h post-training on freezing to context when testing session was performed 2, 7 or 14 days after training, respectively. Statistical analysis of freezing scores at the testing performed 2 days after training revealed a significant effect of pharmacological treatment [$F(4,35)=12.17$; $p < 0.0001$, Fig. 1]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that caffeine, only at the dose of 3 mg/kg, and spermidine (used as a positive control) increased freezing responses at 2 days post-training. Partitioning of the total sum of squares into trend components revealed only a significant quadratic component [$F(1,31)= 6.72$; $p=0.015$], which explained 70% of the total variability due to caffeine, supporting an inverted U-shaped dose-response model for caffeine. Statistical analysis of freezing scores obtained at day 7 after training, also revealed a significant effect of pharmacological treatment [$F(4,59)=2.6$; $p=0.045$, Fig. 2]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that only spermidine (used as a positive control) increased freezing responses at 7 days post-training. Caffeine injection 12 h post-training also did not alter freezing scores of animals tested 14 days after training [$F(3,40)=0.07$; $p=0.974$, Fig. 3]. The statistical analysis of immediate freezing, carried out as control for the acquisition of fear memory, revealed no difference between groups in any of the three experiments (data not shown).

Discussion

In the current study, we showed that delayed caffeine administration (3 mg/kg, i.p., 12 h post-training) increased freezing scores in animals tested 2 days after training (Fig. 1). However, no effect of caffeine were found if animals were tested 7 or 14 days after training

(Fig. 2 and Fig. 3, respectively), suggesting that delayed caffeine administration did not alter memory persistence.

The current results not only constitute additional evidence that caffeine may improve memory consolidation, but that this facilitatory effect may occur several hours after acquisition has occurred. In this regard, it is interesting that only one study has previously evaluated the effect of delayed caffeine injection on memory consolidation in a shock-motivated task. In that study Kopf and colleagues (1999) have shown that while immediately post-training caffeine improves memory consolidation of the step-through inhibitory avoidance, the injection of caffeine 180 min after training did not alter step through latencies at testing, which was carried out 24 hours after training. Therefore, our study supports that there is at least a second time window for the effects of caffeine on memory consolidation, which is around 12 h after training. In fact, this is not the first study to show that late pharmacological manipulation may alter the consolidation of long-term memory. For instance, Signor and colleagues (2014) have shown that 12 h post-training systemic injection of spermidine and arcaine, respectively improves and impairs the memory of fear two days after training. Interestingly, the intrahippocampal injection of spermidine 6 h after training has no effect on memory, also configuring two time windows for the effect of polyamines on the consolidation of long-term memory (Berlese et al. 2005). It is also remarkable that an inverted U-shaped dose-response curve was observed with the doses of caffeine tested in this study, as far as the quadratic component explained most of the variability due to the treatment (see results). This finding is, to some extent, similar to the biphasic effect of immediate post-training caffeine on the memory consolidation of mice (Angelucci et al. 1999; Kopf et al. 1999) and humans (Borota et al. 2014). Such a biphasic effect of caffeine on memory consolidation may be due to the interaction of caffeine with distinct molecular targets, as far caffeine is known to interact with phosphodiesterases, A_1 , A_{2A} and $GABA_A$ receptors and ryanodine-sensitive channels (Nehlig 1992; Porciúncula et al. 2013). Therefore, future experiments should be carried out to unveil the mechanisms by which delayed caffeine administration improves long-term memory consolidation.

One of the main aims of this study was to evaluate whether caffeine facilitated memory persistence, and this was the reason why we used the 12 h post-training injection protocol. Current neurochemical and pharmacological evidence supports that persistence of long-term memory depends on late consolidation, which occurs around 12 h after acquisition, or even later. Accordingly, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Homer 1a, Akt, CamKII, and ERK2 synthesis increase in the hippocampus (Bekinschtein et al. 2010, 2007)

12-24 h after training. Moreover, pharmacological treatments that increase mitogen activated kinases (MAPKs) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation, as well as synthesis of the transcription factors Zif268 and c-Fos within this time window also facilitate memory persistence (Bekinschtein et al. 2010, 2008, 2007). More recent studies have shown that increased activity of muscarinic and nicotinic receptors at the CA1 region 12 h post-training is needed for memory persistence (Parfitt et al. 2012), as well as the activation of dopamine and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and of cAMP-dependent protein kinase (PKA) (Rossato et al. 2009; Signor et al. 2014) and CPEB3-mediated protein synthesis (Fioriti et al. 2015). On the other hand, the activation of opioid and glucocorticoid receptors during this time window decreases the persistence of long-term fear memory (Porto et al. 2015; Yang et al. 2013). However, since recent studies have shown that early protein synthesis and phosphorylation that occur 30 min after training in the retrosplenial cortex and hippocampus may account for inhibitory avoidance and fear memory persistence (Fioriti et al. 2015; Katche and Medina 2015), it is not possible to rule out an effect of caffeine on memory persistence in other experimental conditions.

References

- Angelucci MEM, Vital MAF, Cesário C, Zadusky CR, Rosalen P, Da Cunha C (1999) The effect of caffeine on animal models of learning and memory. *Eur J Pharmacol* 373:135-140
- Baldwin HA, Johnston AL, File SE (1989) Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. *Eur J Pharmacol* 159:211-215
- Bakshi VP, Geyer MA, Taaid N, Swerdlow NR (1995) A comparison of the effects of amphetamine, strychnine and caffeine on prepulse inhibition and latent inhibition. *Behav Pharmacol* 6:801-809
- Beavo JA, Reifsnyder DH (1990) Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 11:150-155
- Bekinschtein P, Katche C, Slipczuk L, Gonzalez C, Dorman G, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2010) Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotox Res* 18:377-385
- 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* 105:2711-2716
- 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
- Berlese DB, Sauzem PD, Carati MC, Guerra GP, Stiegemeier JA, Mello CF, Rubin MA (2005) Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem* 83:48-53
- Bethus I, Tse D, Morris DG (2010) Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. *J Neurosci* 30:1610-1618
- Bhattacharya SK, Satyan KS, Chakrabarti A (1997) Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *J Psychopharmacol* 11:219-224
- Borota D, Murray E, Keceli G, Chang A, Watabe JM, Ly M, Toscano JP, Yassa MA (2014) Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. *Nat Neurosci* 17:201-213
- 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* 214:254-259
- Butcher RW, Sutherland EW (1962) Adenosine-3', 5' - phosphate in biological materials. *J Biol Chem* 273:1244-1250
- Cestari V, Castellano C (1996) Caffeine and cocaine interaction on memory consolidation in mice. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 331:94-104
- Corodimas KP, Pritt JC, Stieg JM (2000) Acute exposure to caffeine selectively disrupts context conditioning in rats. *Psychopharmacology* 152:376-382
- Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR (2007) Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol* 203:241-245
- Dall'Olio R, Gandolfi O, Montanaro N (1978) Effects of pre- and post-trial caffeine administrations upon "step-down" passive avoidance behavior in rats submitted or not to electroconvulsive shock. *Pharmacol Res Commun* 10:851-858
- Daly JW (2007) Caffeine analogs: biomedical impact. *Cell Mol Life Sci* 64:2153-2169
- de Oliveira RV, Dall'Igna OP, Tort AB, Schuh JF, Neto PF, Santos Gomes MW, Souza DO,

- Lara DR (2005) Effect of subchronic caffeine treatment on MK-801-induced changes in locomotion, cognition and ataxia in mice. *Behav Pharmacol* 16:79-84
- Dubroqua S, Low SR, Yee BK, Singer P (2015) Caffeine impairs the acquisition and retention, but not the consolidation of Pavlovian conditioned freezing in mice. *Psychopharmacology* 232:721-31
- Fioriti L, Myers C, Huang YY, Li X, Stephan JS, Trifilieff P, Colnaghi L, Kosmidis S, Drisaldi B, Pavlopoulos E, Kandel ER (2015) The Persistence of Hippocampal-Based Memory Requires Protein Synthesis Mediated by the Prion-like Protein CPEB3. *Neuron* 86:1433-1448
- Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM (2005) Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* 63:191-270
- Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zuvartau EE (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51:83-133
- Gevaerd MS, Takahashi RN, Silveira R, Da Cunha C (2001) Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. *Brain Res Bull* 55:101-106
- Graeff FG, Netto CF, Zangrossi HJr (1998) The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23:237-246
- Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, Chen JF, Schwarzschild MA, Fredholm BB, Urade Y, Hayaishi O (2005) Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci* 8:858-859
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Lima RH, Medina JH, Cammarota M (2008) Age-dependent and age-independent human memory persistence is enhanced by delayed posttraining methylphenidate administration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19504-19507
- Jang Y, Kim J, Shim J, Kim CY, Jang JH, Lee KW, Lee HJ (2013) Decaffeinated coffee prevents scopolamine-induced memory impairment in rats. *Behav Brain Res* 245:113-119
- Jensen TS & Smith DF (1982) Effect of emotions on nociceptive thresholds in rats. *Physiology and Behavior* 28:597-599
- Katche C and Medina JH (2015) Requirement of an early activation of BDNF/c-Fos cascade in the retrosplenial cortex for the persistence of a long-lasting aversive memory. *Cerebral Cortex* 1-8
- Kopf SR, Melani A, Pedata F, Pepeu G (1999) Adenosine and memory storage: effect of A(1)

- and A(2) receptor antagonist. *Psychopharmacology* 146:214-219
- Lader M and Bruce M (1986) States of anxiety and their induction by drugs. *B J Clin Pharmacol* 22:251-261
- Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92:180-185
- McGaugh JL (2015) Consolidating Memories. *Annu Rev Psychol* 66:1-24
- Nardi AE, Lopes FL, Freire RC, Veras AB, Nascimento I, Valenca AM, de-Melo-Neto VL, Soares-Filho GL, King AL, Araujo DM (2009) Panic disorder and social anxiety disorder subtypes in a caffeine challenge test. *Psychiatry Res* 169:149-153
- Nehlig A (1999) Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neurosci Biobehav Rev* 23:563-576
- Nehlig A, Daval JL, Debry GC (1992) Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev* 17:139-170
- Parfitt GM, Campos RC, Barbosa AK, Koth AP, Barros DM (2012) Participation of hippocampal cholinergic system in memory persistence for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiol Learn Mem* 97:183-188
- Petkov VV and Rousseva S (1984) Effects of caffeine on aggressive behavior and avoidance learning of rats with isolation syndrome. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 6:433-436
- Poole RL, Braak D, Gould TJ (2016) Concentration- and age-dependent effects of chronic caffeine on contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 298:69-77
- Porciúncula LO, Sallaberry C, Mioranza S, Botton PH, Rosemberg DB (2013) The Janus face of caffeine. *Neurochem Int* 63:594-609
- Porto GP, Milanesi LH, Rubin MA, Mello CF (2015) Effect of morphine on the persistence of long-term memory in rats. *Psychopharmacology* 232:1747-1753
- Prediger RD, Fernandes MS, Rial D, Wopereis S, Pereira VS, Bosse TS, Da Silva CB, Carradore RS, Machado MS, Cechinel-Filho V, Costa-Campos L (2008) Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol* 120:465-473
- Roesler R and McGaugh JL (2010) Memory Consolidation. In: *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience* (Koob GF, Le Moal M, Thompson RF, eds) 206-214

- Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M (2009) Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325:1017-1020
- 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 immuncontent in middle-aged rats. *Neuropharmacology* 64:153-159
- Sanday L, Zanin KA, Patti CL, Fernandes-Santos L, Oliveira LC, Longo BM, Andersen ML, Tufik S, Frussa-Filho R (2013) Role of state-dependent learning in the cognitive effects of caffeine in mice. *Int J Neuropsychop* 16:1547-1557
- Sansone M, Battaglia M, Castellano C (1994) Effect of caffeine and nicotine on avoidance learning in mice: lack of interaction. *J Pharm Pharmacol* 46:765-767
- Shen Z, Wang G, Lin SZ (1990) Two-way shuttlebox avoidance conditioning and brain NADH in rats. *Physiol Behav* 48:515-517
- Signor C, Mello C, Porto G, Ribeiro D, Rubin M (2014) Spermidine improves fear memory persistence. *Eur J Pharm* 730:72-76
- Slipczuk L, Tomaiuolo M, Garagoli F, Weisstaub N, Kathe C, Bekinschtein P, Medina JH (2013) Attenuating the persistence of fear memory storage using a single dose of antidepressant. *Mol Psychiatry* 18:7-8
- Stefanovich V (1979) Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase (cAMP PDE) and cyclic 3',5'-guanosine monophosphate phosphodiesterase (cGMP PDE) in microvessels isolated from bovine cortex. *Neurochem Res* 4:681-687
- Stone TW, Ceruti S, Abbracchio MP (2009) Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handb Exp Pharmacol* 59:201-220
- Svenningsson P, Nairn AC, Greengard P (2005) DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse. *AAPS J* 7:353-560
- Yang C, Liu JF, Chai BS, Fang Q, Chai N, Zhao LY, Wang JS (2013) Stress within a restricted time window selectively affects the persistence of long-term memory. *PLoS One* 8
- Yoshimura H (2005) The potential of caffeine for functional modification from cortical synapses to neuron networks in the brain. *Curr Neuropharmacol* 3:309-316
- Yonkov DI (1984) Possible role of brain dopaminergic systems in the memory effects of central stimulus. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 6:235-239
- Zarrindast MR and Shafaghi B (1994) Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on acquisition of passive avoidance learning. *Eur J Pharmacol* 256:233-239

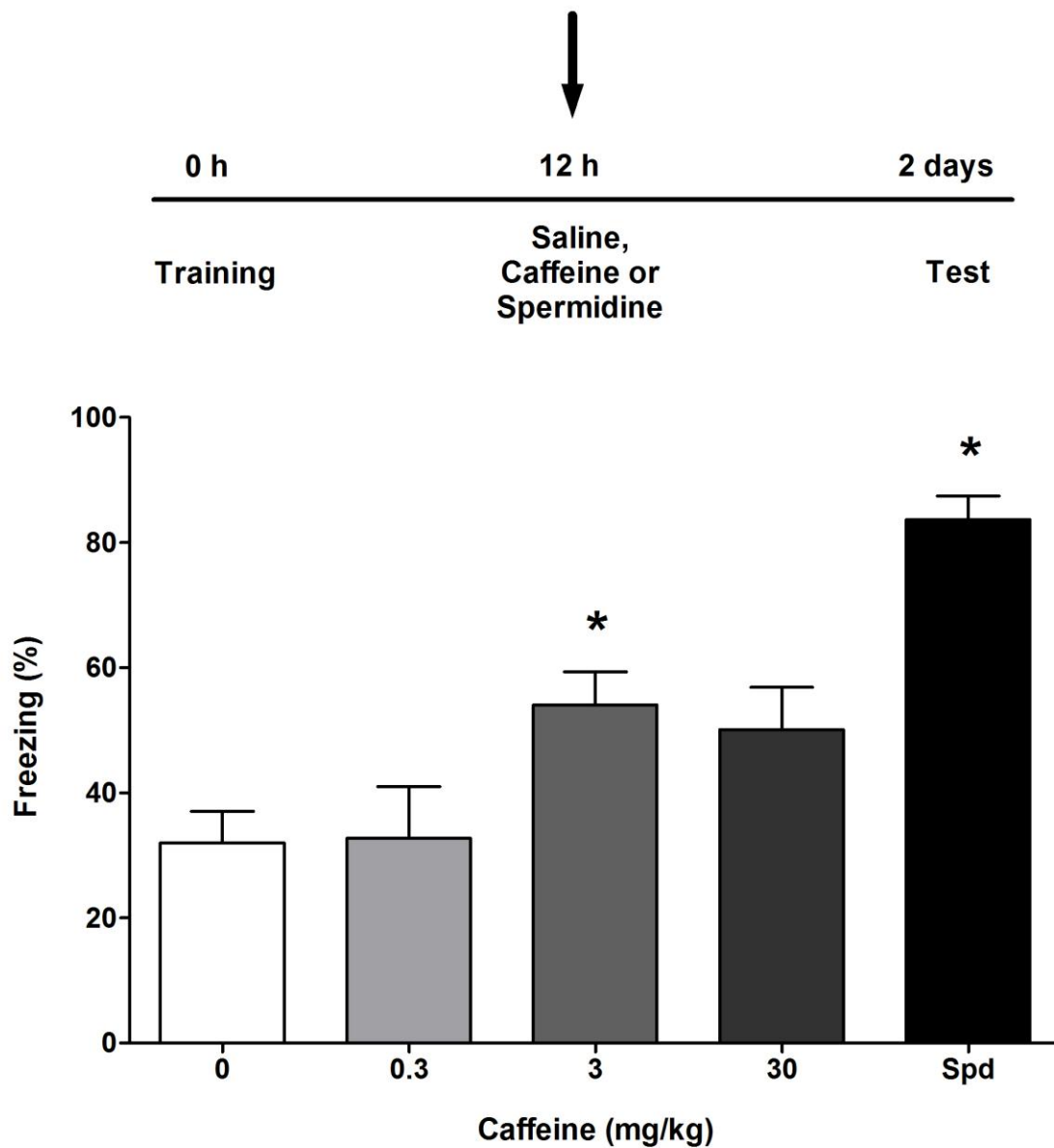


Fig. 1 Effect of caffeine (0.3, 3 or 30 mg/kg, i.p.) and spermidine (Spd - 10 mg/kg, i.p.) injection 12 h post-training on freezing to context. Testing session was performed 2 days post-training. * $p < 0.05$ compared with saline (0.9 % NaCl, i.p.) control by the Bonferroni's test. Data are means \pm SEM ($n = 8$ animals in each group)

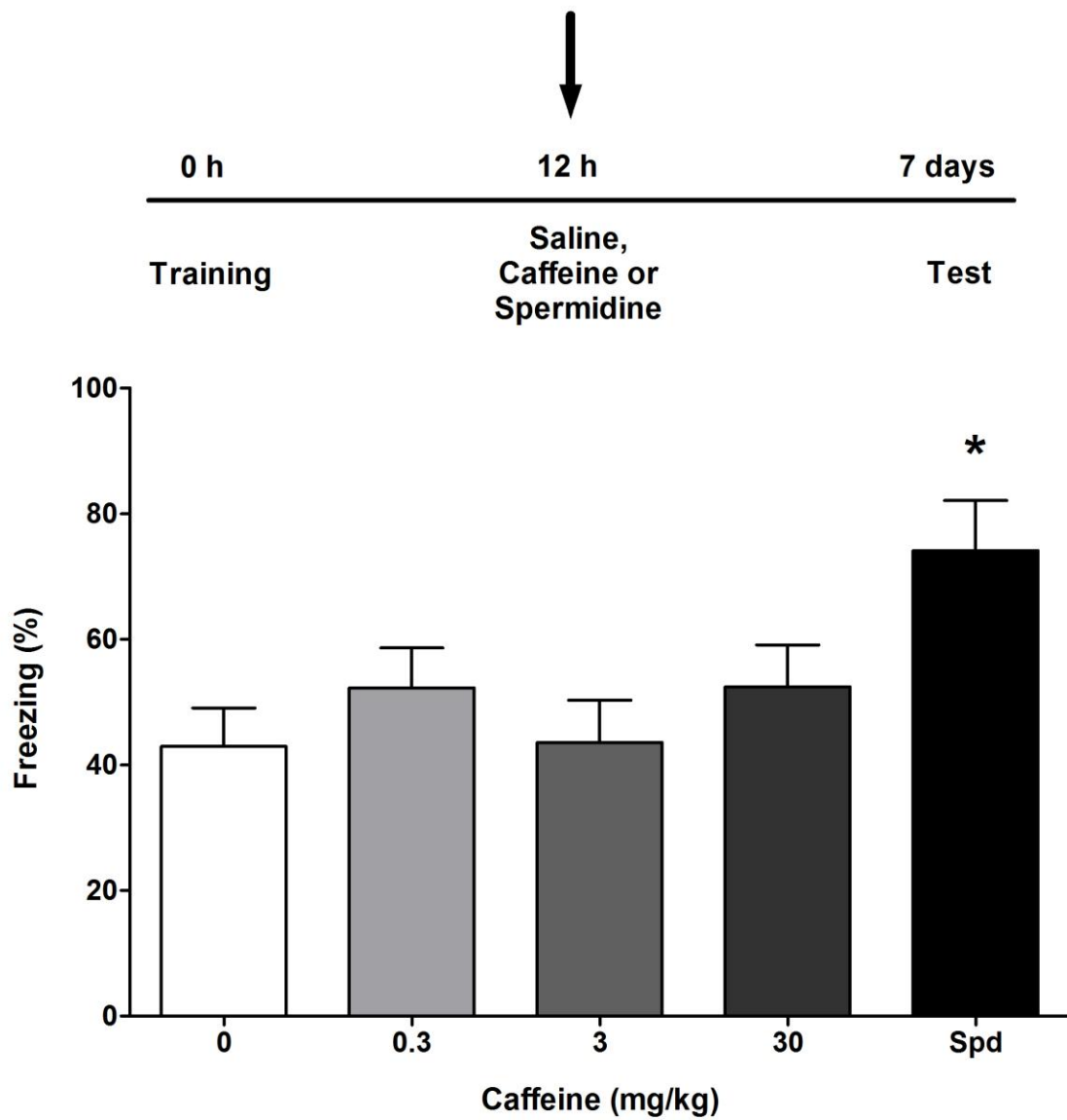


Fig. 2 Effect of caffeine (0.3, 3 or 30 mg/kg, i.p.) and spermidine (Spd - 10 mg/kg, i.p.) injection 12 h post-training on freezing to context. Testing session was performed 7 days post-training. * $p < 0.05$ compared with saline (0.9 % NaCl, i.p.) control by the Bonferroni's test. Data are means \pm SEM (n = 8-14 animals in each group)

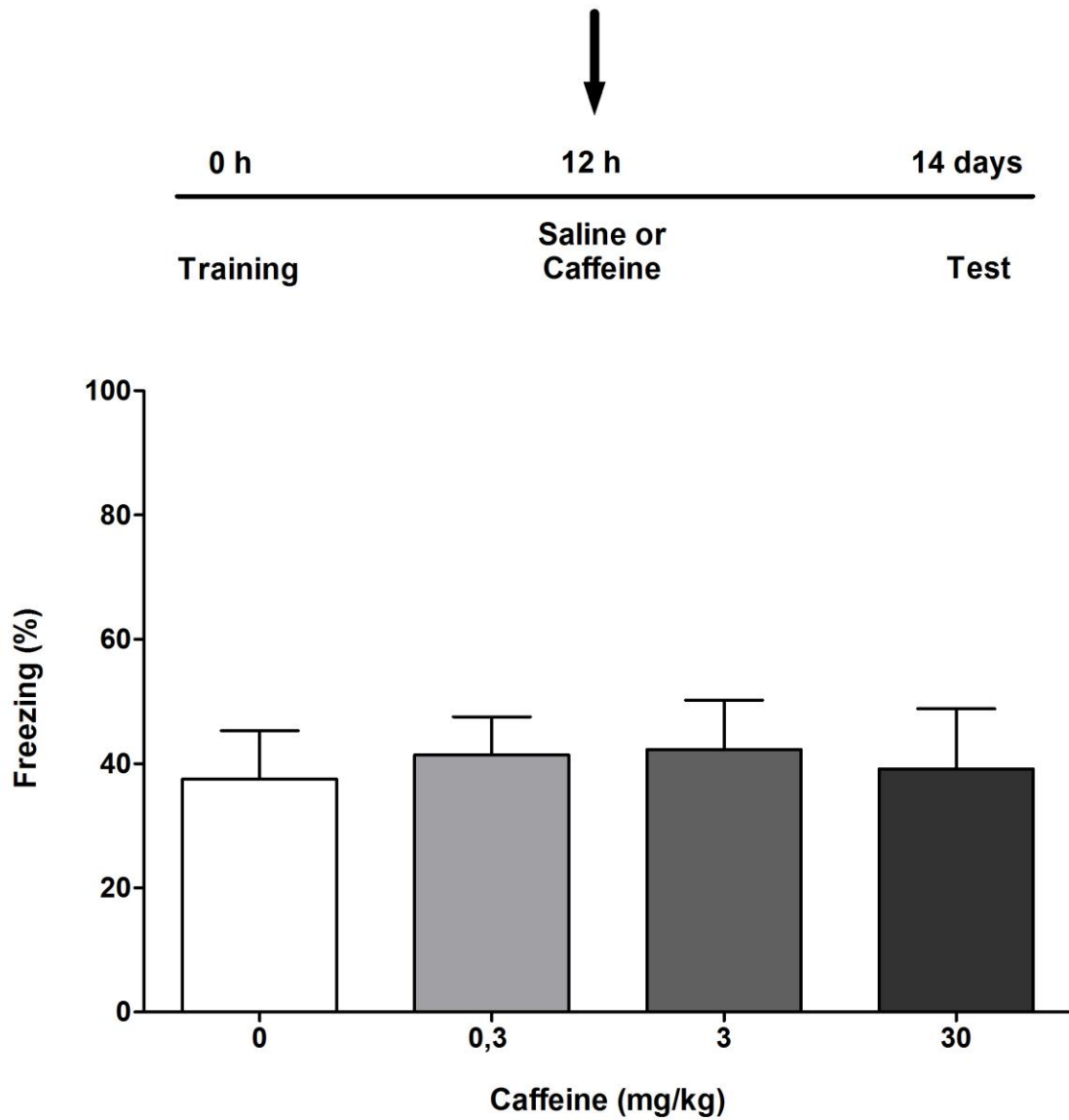


Fig. 3 Effect of caffeine (0.3, 3 or 30 mg/kg, i.p.) injection 12 h post-training on freezing to context. Testing session was performed 14 days post-training. * $p < 0.05$ compared with saline (0.9 % NaCl, i.p.) control by the Bonferroni's test. Data are means \pm SEM (n = 11 animals in each group)

Table 1 Effects of caffeine administration in different methodological issues

| Author | Year | Task | Caffeine dose | Animal used | mA | Method | Result |
|-------------------------|------|------------------------------|-----------------------|-------------|------|--|-----------------------|
| Angelucci et al | 1999 | passive/inhibitory avoidance | 10, 30,100 mg/kg | Mice | 0.15 | 30 min pre-training | impairs |
| | | | 1,3,10, 30 mg/kg | | | immediately pos-training | improves |
| | | | 3, 10 mg/kg | | | 30 min pre-test | improves |
| | | | 3,10,30,100 mg/kg | | | 30 min pre-training and pre-test | impairs |
| Sanday et al | 2013 | passive/inhibitory avoidance | 20 mg/kg | Mice | 0.4 | 30 min pre-training | impairs |
| | | | | | | 30 min pre-test | no effect |
| | | | | | | 30 min pre-training and pre-test | state-dependency |
| Dall'Olio et al | 1978 | passive/inhibitory avoidance | 1 and 2 mg/kg | Rat | 2 | 45 min pre-training | no effect |
| | | | 20 mg/k | | | 45 min pre-trainin | impairs |
| | | | 20 mg/k | | | 45 min pre-training and pre-test | impairs |
| Kopf et al. | 1999 | passive/inhibitory avoidance | 0.3 mg/kg | Mice | 0.4 | immediately after training | improves |
| | | | | | | 180 min after training | no effect |
| Zarrindast and Shafaghi | 1994 | passive/inhibitory avoidance | 50 and 100 mg/kg | Mice | | 60 min pre-training | impairs |
| Cestari et al | 1996 | passive/inhibitory avoidance | 0.25, 0.5 and 1 mg/kg | Mice | | immediately post-training | improves |
| de Oliveira et al | 2005 | passive/inhibitory avoidance | 1 g/l | Mice | 0.2 | prevents the decifit by MK-801; 7 days in drinking water | improves |
| Sallaberry et al | 2013 | passive/inhibitory avoidance | 1 g/l | Rat | 0.5 | 90 min post-training in middle-aged rats; 30 days in drinking water | improves |
| Botton et al | 2010 | passive/inhibitory avoidance | 10 mg/kg i.p. | Mice | 0.5 | Prevents the deficit by scopolamine (pre-training) in a short time; 4 consecutive days | improves |
| | | | | | | Prevents the deficit of short and long term by scopolamine (post-training) | improves |
| Prediger et al | 2008 | passive/inhibitory avoidance | 10 mg/kg | Rat | 0.4 | used was positive control; 30 min pre-training | improves short-memory |

(conclusion)

| | | | | | | | |
|---------------------|------|------------------------------|---------------------|------|------|---|--------------------------|
| Dall'Igna et al | 2007 | passive/inhibitory avoidance | 80 mg/kg | Mice | 0.2 | 30 min before A β administration | improves |
| | | | 30 mg/kg | | | 30 min before A β administration | no effect |
| | | | 30 mg/kg | | | subchronic treatment (4 days) | improves |
| | | | 1g/l | | | prolonged treatment (12 days in drinking water) | no effect |
| | | | 1 g/l + 30 mg/kg | | | combination (12 days in drinking water + 30 mg/kg) 30 min before A β administration | improves |
| Corodimas et al | 2000 | fear conditioned freezing | 20 and 30 mg/kg | Rat | 1 | 15 min pre-test | impairs |
| | | | pellet subcutaneous | | | subcutaneous pellet by 7 days | no effect |
| Dubroqua et al | 2015 | fear conditioned freezing | 30 mg/kg | Mice | 0.3 | 10 min pre-training | impairs |
| | | | | | | 10 min pre-test | impairs |
| Poole et al | 2016 | fear conditioned freezing | 1 g/l | Mice | 0.62 | chronic treatment in adolescent and pre-adolescent; 14 days in drinking water | improves |
| | | | | | | withdrawal in the 12 day, training on 13 day and testing session in 14 day - pre adolescent | impairs |
| | | | | | | withdrawal in the 12 day, training on 13 day and testing session in 14 day - adolescent and adult | no effect |
| Gevaerd et al | 2001 | two-way avoidance | 0.1 mg/kg | Rat | 0.4 | 45 min pre-training | no effect |
| | | | 1 mg/kg | | | 45 min pre-training | impairs |
| Petkov and Rousseva | 1984 | two-way avoidance | 40 mg/kg | Rat | | 60 min before training | improves the acquisition |
| Sansone et al | 1994 | two-way avoidance | 10 mg/kg | Mice | 0.2 | pre-training | impairs |
| Shen et al | 1990 | two-way avoidance | 120 and 75 mg/kg | Rat | | 15 min pre-test | no effect |
| Yonkov | 1984 | active avoidance | 20 mg/kg | Rat | | immediately post-training | improves |
| Bakshi et al | 1995 | active avoidance | 10 mg/kg | Rat | 1 | 5 min pre-training | no effect |

5 DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos que a administração de cafeína 12 horas após o treino aumenta os escores de *freezing* avaliado 2 dias após o treino. Contudo, a administração de cafeína 12 horas após o treino não tem efeito sobre os escores de *freezing* de testes realizados 7 ou 14 dias após o treino. Nós também mostramos que a administração da poliamina espermidina aumenta os escores de *freezing* 2 e 7 dias após o treino.

Estudos prévios descrevem o efeito facilitador da espermidina sobre a memória em diferentes tarefas comportamentais (Camera et al., 2007; Guerra et al., 2012, 2011, 2006; Signor et al., 2014). Portanto, neste estudo, a espermidina foi utilizada como controle positivo da melhora da memória, avaliada através dos escores de *freezing*, em animais testados 2 e 7 dias após o treino. O efeito de melhora da memória pela administração sistêmica de espermidina, observado em animais testados 7 dias após o treino, é também geralmente observado em 14 dias, relacionado a memória de longa duração, que tem como característica a persistência ao longo do tempo.

Inicialmente foi proposto que a persistência da memória de longo prazo depende de uma consolidação tardia, em torno de 12 horas após a aquisição, ou até mesmo mais tarde (Rossato et al., 2009; Bekinschtein et al., 2008). Contudo, outros estudos mostraram que a persistência da memória também depende de uma consolidação mais precoce, a qual ocorre em torno de 6 horas após a aquisição (Alberini & Kandel, 2014; Bekinschtein et al., 2007; Izquierdo, 2004), ou até mesmo de eventos que ocorram imediatamente após o treino. Kopf e colegas, em 1999, mostraram que a administração de cafeína imediatamente após o treino melhora a memória, porém quando a cafeína foi administrada tardiamente, 180 min após o treino, não foi observado nenhum efeito da cafeína sobre a consolidação da memória. Assim, o período em que a cafeína é administrada parece ser muito importante para o desempenho dos animais em determinada tarefa.

Portanto, um dos principais objetivos deste estudo foi avaliar se a administração tardia de cafeína facilitaria a persistência da memória de medo, justificando o emprego do protocolo de administração 12 horas após treino. Nossos resultados mostram que a administração tardia de cafeína facilita a consolidação da memória, mas não altera a persistência da memória de medo em ratos. Os resultados do presente estudo não são apenas evidências adicionais que a cafeína pode melhorar a consolidação da memória, mas que o efeito facilitador da cafeína pode ocorrer algumas horas após a aquisição, suportando a hipótese de que os eventos que ocorrem 12 horas após o treino são importantes para a consolidação da memória.

Neste estudo, sugere-se que o efeito de melhora da memória em animais testados 2 dias, com a administração de cafeína 12 horas após o treino, esteja relacionado à memória propriamente dita e conseqüentemente aos eventos bioquímicos que ocorrem em torno de 12 horas após o treino. Quanto ao mecanismo de ação da cafeína e envolvimento dos receptores para adenosina do subtipo A_1 e A_{2A} , ou o envolvimento apenas do receptor A_{2A} , na melhora da memória observada neste estudo, não se pode afirmar nenhum alvo específico, pois não foram utilizados antagonistas ou agonistas para os receptores de adenosina, para comprovação do efeito, e também devido às constantes de afinidade (K) da cafeína para os receptores de adenosina serem muito semelhantes entre si, em humanos (Quadro 1) e ratos (Quadro 2). Outro possível alvo para a ação da cafeína são as fosfodiesterases, porém a cafeína e outras metilxantinas apresentam baixa afinidade, sendo necessário altas concentrações para serem observados efeitos significativos.

Conforme protocolo utilizado neste estudo, é pouco provável que a cafeína interfira no estado motivacional do animal submetido à tarefa (pois a administração de cafeína é realizada após o treino, e não pré-treino), ou interfira na evocação da memória (devido à curta meia-vida da cafeína, em torno de 1 hora em ratos) realizada 36 horas após a administração de cafeína.

Portanto, com o presente estudo mostramos que a administração de cafeína, 12 horas após o treino, melhora a consolidação tardia da memória de medo, e não tem efeito sobre a persistência desta memória.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, a administração de cafeína de forma tardia, 12 horas após o treino, aumentou os escores de *freezing* ao contexto de ratos testados 2 dias após o treino, mas não alterou de forma significativa os escores de *freezing* ao contexto de ratos testados 7 ou 14 dias após o treino. Estes dados sugerem que a cafeína interfere na consolidação da memória de medo contextual de forma tardia, mas não sobre a persistência da memória de medo em ratos. Mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação pela qual a cafeína provoca os efeitos encontrados neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC. **Associação Brasileira da Indústria do Café.** Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 04 jul. 2016.

Abrams, J.K.; Johnson, P.L.; Hay-Schmidt, A.; Mikkelsen, J.D.; Shekhar, A.; Lowry, C.A. Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. **Neurosci**, v. 133, p. 983-997, 2005.

Acquas, E.; Tanda, G.; Di Chiara, G. Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeinepre-treated rats. **Neuropsychopharmacol**, v. 27, p.182-193, 2002.

Alberini, C.M. & Kandel, E.R. The regulation of transcription in memory consolidation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, 2014.

Angelucci, M.E.; Cesário, C.; Hiroi, R.H.; Rosalen, P.L.; Da Cunha, C. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, p. 1201-1208, 2002.

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**, v. 373, p. 135-140, 1999.

Arendash, G.W.; Schleif, W.; Rezai-Zadeh, K.; Jackson, E.K.; Zacharia, L.C.; Cracchiolo, J.R.; Shippy, D.; Tan, J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. **Neuroscience**, v. 142, p. 941-952, 2006.

Arnaud, M.J. Metabolism of caffeine and other components of coffee, in *Caffeine, Coffee and Health* (Garattini S ed) p. 43-95, **Raven Press**, 1993.

Arnaud, M.J. Comparative metabolic disposition of [1-Me¹⁴C] caffeine in rats, mice, and Chinese hamsters. **Drug Metab Dispos**, v. 13, p. 471-478, 1985.

Arnaud, M.J. Identification, kinetic and quantitative study of [2-¹⁴C] and [1-Me-¹⁴C] caffeine metabolites in rat's urine by chromatographic separations. **Biochem Med**, v. 16, p. 67-76, 1976.

Aronsen, L.; Orvoll, E.; Lysaa, R.; Ravna, A.W.; Sager, G. Modulation of high affinity ATP-dependent cyclic nucleotide transporters by specific and non-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. **Eur J Pharmacol**, v. 15, p. 249-253, 2014.

Ascherio, A.; Zhang, S.M.; Hernán, M.A.; Kawachi, I.; Colditz, G.A.; Speizer, F.E.; Willett W.C. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Ann Neurol**, v. 50, p. 56-63, 2001.

Baddley, A. D. & Navarro, G. E. *Memoria humana: teoría y práctica.* **McGraw-Hill Interamericana de España S.L.** 1999.

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

Bakshi, V.P.; Geyer, M.A.; Taaid, N.; Swerdlow, N.R. A comparison of the effects of amphetamine, strychnine and caffeine on prepulse inhibition and latent inhibition. **Behav Pharmacol**, v. 6, p. 801-809, 1995.

Bear, M.F.; Connors, B.W.; Paradiso, M.A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. Porto Alegre, **Artmed**, 2008.

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

Belza, A.; Toubro, S.; Astrup, A. The effect of caffeine, green tea and tyrosine on thermogenesis and energy intake. **Eur J Clin Nutr**, v. 63, p. 57-64, 2009.

Bennett, A.W. & Bonnie. K.B. The World of Caffeine: The Science and Culture of the World's Most Popular Drug. **Routledge**, 2002.

Bertarelli, D.C.; Diekmann, M.; Hayallah, A.M.; Rüsing, D.; Iqbal, J.; Preiss, B.; Verspohl, E.J.; Müller, C.E. Characterization of human and rodent native and recombinant adenosine A(2B) receptors by radioligand binding studies. **Purinergic Signal**, v. 2, p. 559-571, 2006.

Bhupathiraju, S.N.; Pan, A.; Malik, V.S.; Manson, J.E.; Willett, W.C.; van Dam, R.M.; Hu, F.B. Caffeinated and caffeine-free beverages and risk of type 2 diabetes. **Am J Clin Nutr**, v. 97, p. 155-166, 2013.

Boison, D.; Chen, J. F.; & Fredholm, B. B. Adenosine signaling and function in glial cells. **Cell Death Differ**, v. 17, p. 1071-1082, 2010.

Bonati, M.; Latini, R.; Galletti, F.; Young, J.F.; Tognoni, G.; Garattini, S. Caffeine disposition after oral doses. **Clin Pharmacol Ther**, v. 32, p. 98-106, 1982.

Borota, D.; Murray, E.; Keceli, G.; Chang, A.; Watabe, J.M.; Ly, M.; Toscano, J.P.; Yassa, M.A. Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. **Nat Neurosci**, v. 17, p. 201-203, 2014.

Borrmann, T.; Hinz, S.; Bertarelli, D.C.; Li, W.; Florin, N.C.; Scheiff, A.B.; Müller, C.E. 1-alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines: development and characterization of adenosine A2B receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity. **J Med Chem**, v. 52, p. 3994-4006, 2009.

Botton, P.H.; Costa, M.S.; Ardais, A.P.; Mioranza, S.; Souza, D.O.; da Rocha, J.B.; Porciúncula, L.O. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. **Behav Brain Res**, v. 214, p. 254-259, 2010.

Brackett, L.E.; Daly, J.W. Functional characterization of the A2b adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts. **Biochem Pharmacol**, v. 47, p. 801-814, 1994.

- Camera, K.; Mello, C.F.; Ceretta, A.P.; Rubin, M.A. Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. **Psychopharmacology**, v. 192, p. 457-464, 2007.
- Canas, P.M.; Porciúncula, L.O.; Cunha, G.M.; Silca, C.G.; Machado, N.J.; Oliveira, J.M.; Oliveira, C.R.; Cunha, R.A. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **J Neurosci**, v. 29, p. 14741-14751, 2009.
- Cano-Marquina, A.; Tarín, J.J.; Cano, A. The impact of coffee on health. **Maturitas**, v. 75, p. 17-21, 2013.
- Cardinali, D.P. Methylxanthines: possible mechanisms of action in brain. **Trends Pharmacol Sci**, v.1, p. 405-407, 1980.
- Cestari, V.; Castellano, C. Caffeine and cocaine interaction on memory consolidation in mice. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 331, p. 94-104, 1996.
- Chen, J. Adenosine Receptor Control of Cognition in Normal and Disease. **Int Rev Neurobiol**, v. 119, p. 257-307, 2014.
- Chen, X.; Lan, X.; Roche, I.; Liu, R.; Geiger, J.D. Caffeine protects against MPTP-induced blood-brain barrier dysfunction in mouse striatum. **J Neurochem**, v. 107, p. 1147-1157, 2008.
- Chen, J.F.; Xu, K.; Petzer, J.P.; Staal, R.; Xu, Y.H. Beilstein, M.; Sonsalla, P.K.; Castagnoli, K.; Castagnoli, N. Jr.; Schwarzschild, M.A. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. **J of Neurosci**, v. 21, RC143, 2001.
- Chu, N.S. Caffeine- and aminophylline-induced seizures. **Epilepsia**, v. 22, p. 85-94, 1981.
- Costa, M.S.; Botton, P.H.; Mioranza, S.; Ardais, A.P.; Moreira, J.D.; Souza, D.O.; Porciúncula, L.O. Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunocontent in the hippocampus. **Neurochem Int**, v. 53, p. 89-94, 2008.
- Corodimas, K.P.; Pruitt, J.C.; Stieg, J.M. Acute exposure to caffeine selectively disrupts context conditioning in rats. **Psychopharmacology**, v. 152, p. 376-382, 2000.
- Cunha, R.A. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A(1) receptor activation to A(2A) receptor blockade. **Purinergic Signal**, v. 1, p. 111-134, 2005.
- Cunha, R.A. & Agostinho, P.M. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. **J Alzheimers Dis**, v. 20, p. 95-116, 2010.
- Dall'Igna, O.P.; Fett, P.; Gomes, M.W.; Souza, D.O.; Cunha, R.A.; Lara, D.R. Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Exp Neurol**, v. 203, p. 241-245, 2007.
- Dall'Igna, O.P.; Porciúncula, L.O.; Souza, D.O.; Cunha, R.A.; Lara, D. R. Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. **Br J Pharmacol**, v. 138, 1207-1209, 2003.

- Dall'Olio, R.; Gandolfi, O.; Montanaro, N. Effects of pre- and post-trial caffeine administrations upon "step-down" passive avoidance behavior in rats submitted or not to electroconvulsive shock. **Pharmacol Res Commun**, v. 10, p. 851-858, 1978.
- Daly, J.W.; Fredholm, B.B. Caffeine—an atypical drug of dependence. **Drug Alcohol Depend**, v. 51, p. 199-206, 1998.
- Daly, J.W.; Hide, I.; Müller, C.E.; Shamim, M. Caffeine analogs: structure-activity relationships at adenosine receptors. **Pharmacology**, v. 42, p. 309-321, 1991.
- Deckert, J.; Berger, W.; Kleopa, K.; Heckers, S.; Ransmayr, G.; Heinsen, H.; Beckmann, H.; Riederer, P. Adenosine A1 receptors in human hippocampus: inhibition of [3H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine binding by antagonist drugs. **Neurosci Lett**, v. 150, p. 191-194, 1993.
- Dews, P.B. Caffeine. **Annu Rev Nutr**, v. 2, p. 323-341, 1982.
- Di Lorio, P.; Battaglia, G.; Ciccarelli, R.; Ballerini, P.; Giuliani, P.; Poli, A.; Nicoletti, F.; Caciagli, F. Interaction between A1 adenosine and class II metabotropic glutamate receptors in the regulation of purine and glutamate release from rat hippocampal slices. **J Neurochem**, v. 67, p. 302-309, 1996.
- Dubroqua, S.; Low, S.R.; Yee, B.K.; Singer, P. Caffeine impairs the acquisition and retention, but not the consolidation of Pavlovian conditioned freezing in mice. **Psychopharmacology**, v. 232, p. 721-731, 2015.
- Dudai, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annu Rev Physiol**, v. 55, p. 51-86, 2004.
- El Yacoubi, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Costentin, J.; Vaugeois, J.M. The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A(2A) adenosine receptor antagonists. **Psychopharmacology**, v. 148, p. 153-163, 2000.
- Ferré, S. Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. **J Alzheimers Dis**, v. 20, p. 35-49, 2010.
- Ferré, S.; Goldberg, S.R.; Luis, C.; Franco, R. Looking for the role of cannabinoid receptor heteromers in striatal function. **Neuropharmacol** v. 56, p. 226-234, 2009.
- Ferré, S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. **J Neurochem**, v. 105, p. 1067-1079, 2008.
- Ferré, S.; Popoli, P.; Rimondini, R.; Reggio, R.; Kehr, J.; Fuxe, K. Adenosine A2A and group I metabotropic glutamate receptors synergistically modulate the binding characteristics of dopamine D2 receptors in the rat striatum. **Neuropharmacol**, v. 38, p. 129-140, 1999.
- Ferré, S.; Fuxe, K.; von Euler, G.; Johansson, B.; Fredholm, B.B. Adenosine-dopamine interactions in the brain. **Neurosci**, v. 51, p. 501-512, 1992.

Francis, S.H.; Sekhar, K.R.; Ke, H.; Corbin, J.D. Inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases by methylxanthines and related compounds. **Handb Exp Pharmacol**, v. 200, p. 93-133, 2010.

Fredholm, B.B.; Chen, J.F.; Cunha, R.A.; Svenningsson, P.; Vaugeois, J.M. Adenosine and brain function. **Int Rev Neurobiol**, v. 63, p. 191-270, 2005.

Fredholm, B.B.; IJzerman, A.P.; Jacobson, K.A.; Klotz, K.N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 53, p. 527-552, 2001.

Fredholm, B.B.; Battin, K.; Holmén, J.; Nehlig, A.; Zvartau, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol Rev**, v. 51, p. 83-133, 1999.

Furusawa, K. Drug effects on cognitive function in mice determined by the non-matching to sample task using a 4-arm maze. **Jpn J Pharmacol**, v. 56, p. 483-493, 1991.

Fuxe, K.; Ferre, S.; Genedani, S.; Franco, R.; Agnati, L. F. Adenosine receptor–dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. **Physiol Behav**, v. 92, p. 210-217, 2007.

Gelber, R.P.; Petrovitch, H.; Masaki, K.H.; Ross, G.W.; White, L.R. Coffee intake in midlife and risk of dementia and its neuropathologic correlates. **J Alzheimers Dis**, v. 23, p. 607-615, 2011.

Gevaerd, M.S.; Takahashi, R.N.; Silveira, R.; Da Cunha, C. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. **Brain Res Bull**, v. 55, p. 101-106, 2001.

Glade, M.J. Caffeine - not just a stimulant. **Nutrition**, v. 26, p. 932-938, 2010.

Gomes, C.V.; Kaster, M.P.; Tomé, A.R.; Agostinho, P.M.; Cunha, R.A. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, p. 1380-1399, 2011.

Guerra, G.P.; Mello, C.F.; Bochi, G.V.; Rosa, M.M.; Rubin, M.A. Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A. **J Neurochem**, v. 122, p. 363-373, 2012.

Guerra, G.P.; Mello, C.F.; Bochi, G.V.; Rubin, M.A. Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. **Learn Mem**, v. 96, p. 324-332, 2011.

Guerra, G.P.; Mello, C.F.; Sauzem, P.D.; Berlese, D.B.; Furian, A.F.; Tabarelli, Z.; Rubin, M.A. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology**, v. 186, p. 150-158, 2006.

Ham, J. & Evans, B.A.J. An emerging role for adenosine and its receptors in bone homeostasis. **Front Endocrinol**, v. 3, p. 1-8, 2012.

Haskell, C.F.; Kennedy, D.O.; Milne, A.L.; Wesnes, K.A.; Scholey, A.B. The effects of L-theanine, caffeine and their combination on cognition and mood. **Biol Psychol**, v. 77, p. 113-122, 2008.

Hudzik, T.J. & Wegner, G.R. Effects of drugs of abuse and cholinergic in the squirrel monkey. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 265, p. 120-127, 1993.

Iuphar. **Database - Caffeine**. Disponível em: <<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?tab=biology&ligandId=407>>. Acesso em: 04 jul. 2016.

Izquierdo, I. Memória, **Artmed**, 2011.

Izquierdo, I.; Cammarota, M.; Medina, J.H.; Bevilaqua, L.R. Pharmacological findings on the biochemical bases of memory processes: a general view. **Neural Plast**, v. 11, p. 159-189, 2004.

Izquierdo, I. Memória: Iván Izquierdo, **Artmed**, 2002.

Jacobson, K.A.; IJzerman, A.P.; Linden, J. 1,3-Dialkylxanthine derivatives having high potency as antagonists at human A2B adenosine receptors. **Drug Dev Res**, v. 47, p. 45-53, 1999.

Jang, Y.; Kim, J.; Shim, J.; Kim, C.Y.; Jang, J.H.; Lee, K.W.; Lee, H. J. Decaffeinated coffee prevents scopolamine-induced memory impairment in rats. **Behav Brain Res**, v. 245, p. 113-119, 2013.

Juliano, L.M.; Griffiths, R.R. A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. **Psychopharmacology**, v. 176, p. 1-29, 2004.

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

Kim, D.S. & Palmiter, R.D. Interaction of dopamine and adenosine receptor function in behavior: studies with dopamine- deficient mice. **Front Biosci**, v. 13, p. 2311-2318, 2008.

Khaliq, S.; Haider, S.; Naqvi, F.; Perveen, T.; Saleem, S.; Haleem, D.J. Altered brain serotonergic neurotransmission following caffeine withdrawal produces behavioral deficits in rats. **Pak J Pharm Sci**, v. 25, p. 21-25, 2012.

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

Kudlacek, O.; Just, H.; Korkhov, V.M.; Vartian, N.; Klinger, M.; Pankevych, H.; Yang, Q.; Nanoff, C.; Freissmuth, M.; Boehm, S. The human D2 dopamine receptor synergizes with the A2A adenosine receptor to stimulate adenylylcyclase in PC12 cells. **Neuropsychopharmacol**, v. 28, p. 1317-1327, 2003.

- Kull, B.; Arslan, G.; Nilsson, C.; Owman, C.; Lorenzen, A.; Schwabe, U.; Fredholm, B.B. Differences in the order of potency for agonists, but not antagonists, at human and rat adenosine A_{2A} receptors. **Biochem Pharmacol**, v. 57, p. 65-75, 1999.
- Li, X.D.; He, R.R.; Qin, Y.; Tsoi, B.; Li, Y.F.; Ma, Z.L.; Yang, X.; Kurihara, H. Caffeine interferes embryonic development through over-stimulating serotonergic system in chicken embryo. **Food Chem Toxicol**, v. 50, p. 1848-1853, 2012.
- Lieberman, H.R.; Tharion, W.J.; Shukitt-Hale, B.; Speckman, K.L.; Tulley, R. Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during US Navy SEAL training. **Psychopharmacology**, v. 164, p. 250-261, 2002.
- Lindsay, J.; Laurin, D.; Verreault, R.; Hébert, R.; Helliwell, B.; Hill, G.B. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. **Am J Epidemiol**, v. 156, p. 445-453, 2002.
- Maia, L. & de Mendonça, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? **Eur J Neurol**, v. 9, p. 377-382, 2002.
- Marangos, P.J.; Martino, A.M.; Paul, S.M.; Skolnick, P. The benzodiazepines and inosine antagonize caffeine-induced seizures. **Psychopharmacology**, v. 72, p. 269-273, 1981.
- Marks, V. & Kelly, J.F. Absorption of caffeine from tea, coffee, and coca cola. **Lancet**, v. 1, p. 827, 1973.
- McGaugh, J. L.; Izquierdo, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, p. 208-210, 2000.
- Mejia, E.G. & Ramirez-Mares, M.V. Impact of caffeine and coffee on our health. **Trends Endocrin Met**, v. 25, p. 489-492, 2014.
- Mukhopadhyay, S. & Poddar, M.K. Caffeine-induced locomotor activity: possible involvement of GABAergic-dopaminergic-adenosinergic interaction. **Neurochem Res**, v. 20, p. 39-44, 1995.
- Morgan, K.J.; Stults, V.J.; Zabik, M.E. Amount and dietary sources of caffeine and saccharin intake by individuals ages 5 to 18 years. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 2, p. 296-307, 1982.
- Müller, C.P. & Shumann, G. Drugs as instruments: a new framework for non-addictive psychoactive drug use. **Behav Brain Sci**, v. 34, p. 293-310, 2011.
- Nadel, L.; Hupbach, A.; Gomez, R.; Newman--Smith, K. Memory formation, consolidation and transformation. **Neurosci Biobehav R**, v. 36, p. 1640-1645, 2012.
- Nairon, A.F. "De Saluberrimá Cahue seu Café nuncupata Discursus". 1671.
- NCA. National Coffee Association. **National Coffee Drinking Trends**. Disponível em: <<http://www.ncausa.org>>. Acesso em: 05 jul. 2016.
- Nehlig, A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, p. 563-576, 1999.

Neves, C. **A estória do café**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 52p, 1974.

OIC. Organização Internacional do Café. **Relatório mensal sobre o mercado de café**. Março, 2015. Disponível em: <<http://www.ico.org>>. Acesso em: 04 jul. 2016.

O'Keefe, J.H.; Bhatti, S.K.; Patil, H.R.; DiNicolantonio, J.J.; Lucan, S.C.; Lavie, C. J. Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, p. 1043-1051, 2013.

Poole, R.; Braak, D.; Gould, T. Concentration- and age-dependent effects of chronic caffeine on contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. **Behav Brain Res**, v. 298, p. 69-77, 2016.

Prediger, R.D.; Batista, L.C.; Takahashi, R.N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol Aging**, v. 266, p. 957-964, 2005a.

Prediger, R.D.; Fernandes, D.; Takahashi, R.N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behav Brain Res**, v. 159, p. 197-205, 2005b.

Prediger, R.D.; Pamplona, F.A.; Fernandes, D.; Takahashi, R.N. Caffeine improves spatial learning deficits in animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)-the spontaneously hypertensive rat (SHR). **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 8, p. 585-594, 2005c.

Prediger, R.D.; Takahashi, R.N. Modulation of short-term social memory in rats by adenosine A1 and A(2A) receptors. **Neurosci Lett**, v. 376, p. 160-165, 2005d.

PubChem **Caffeine**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519#section=Top>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

Quillfeldt, J.A. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. **Behav Methods Learn & Memory**, v. 21, p. 1-42, 2006.

Quiroz, C.; Gomes, C.; Pak, A.C.; Ribeiro, J.A.; Goldberg, S.R.; Hope, B.T.; Ferré, S.; Blockade of adenosine A2A receptors prevents protein phosphorylation in the striatum induced by cortical stimulation. **J Neurosci**, v. 26, p. 10808-10812, 2006.

Riedel, W.; Hogervorst, E.; Leboux, R.; Verhey, F.; van Praag, H.; Jolles, J. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. **Psychopharmacology**, v. 122, p. 158-168, 1995.

Ritchie, K.; Carrière, I.; de Mendonca, A.; Portet, F.; Dartigues, J.F.; Rouaud, O.; Barberger-Gateau, P.; Ancelin, M.L. The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). **Neurology**, v. 69, p. 536-345, 2007.

Rodrigues, N.P. & Bragagnolo, N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC-DAD-MS. **J Food Comp Anal**, v. 32, p. 105-115, 2013.

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

- Sanday, L.; Zanin, K.A.; Patti, C.L.; Fernandes-Santos, L.; Oliveira, L.C.; Longo, B.M.; Andersen, M.L.; Tufik, S.; Frussa-Filho, R. Role of state-dependent learning in the cognitive effects of caffeine in mice. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, p. 1547-1557, 2013.
- Signor, C.; Mello, C.; Porto, G.; Ribeiro, D.; Rubin, M. Spermidine improves fear memory persistence. **Eur J Pharm**, v. 730, p. 72-76, 2014.
- Shapiro, R.E. Caffeine and headaches. **Neurol Sci**, v. 28, p. 179-183, 2007.
- Smith, A.; Sutherland, D.; Christopher, G. Effects of repeated doses of caffeine on mood and performance of alert and fatigued volunteers. **J Psychopharmacol**, v. 19, p. 620-626, 2005.
- Smith, A.; Maben, A.; Brockman, P. Effects of evening meals and caffeine on cognitive performance, mood and cardiovascular functioning. **Appetite**, v. 22, p. 57-65, 1994.
- Spealman, R.D. Psychomotor stimulant effects of methylxanthines in squirrel monkeys: relation to adenosine antagonism. **Psychopharmacology**, v. 95, p. 19-24, 1988.
- Squire, L. R.; Stark, C. E. L.; Clark, R. E. The Medial Temporal Lobe. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 279-306, 2004.
- Svenningsson, P. et al. Antagonism of adenosine A_{2A} receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. **Neurosci**, v. 79, p. 753-764, 1977.
- Stickgold, R. Sleep-dependent memory consolidation. **Nature**, v. 437, p. 1272-1278, 2005.
- Takahashi, R.N.; Pamplona, F.A.; Prediger, R.D. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. **Front Biosci**, v. 13, p. 2614-2632, 2008.
- Yonkov, D.I. Possible role of brain dopaminergic systems in the memory effects of central stimulus. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 6, p. 235-239, 1984.