

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA CAFEÍNA SOBRE AS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS APRESENTADAS POR
CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA O RECEPTOR DE
LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE (LDL)**

Jozimar Carlos Szczepanik

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger

Florianópolis, Março de 2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Szczepanik, Jozimar Carlos

Investigação dos efeitos da cafeína sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas apresentadas por camundongos nocautes para o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) / Jozimar Carlos Szczepanik ; orientador, Rui Daniel Schröder Prediger - Florianópolis, SC, 2015.

87 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

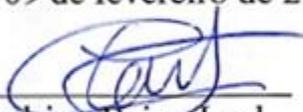
1. Neurociências. 2. Cafeína. 3. Locomoção. 4. Cognição. 5. Hipercolesterolemia familiar. I. Schröder Prediger, Rui Daniel. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

JOZIMAR CARLOS SZCZEPANIK

**“INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA CAFEÍNA SOBRE
AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
NEUROQUÍMICAS APRESENTADAS POR
CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA O RECEPTOR DE
LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE (LDL)”**

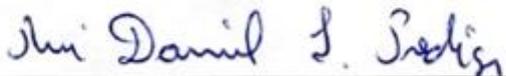
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 09 de fevereiro de 2015.

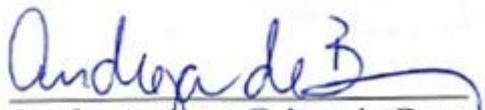


Prof. Rodrigo Bainy Leal
Coordenador do Curso

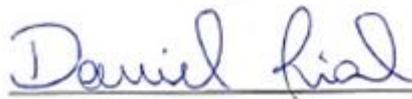
Banca Examinadora:



Prof. Rui Daniel Schröder Prediger
Orientador – UFSC



Profa. Andreza Fabro de Bem
Membro – UFSC



Prof. Daniel Rial
Membro externo à UFSC



Prof. Rodrigo Bainy Leal
Membro - UFSC

AGRADECIMENTOS

O meu trabalho não se relaciona ao âmbito das verdades, porque a Ciência não se trata da verdade. No entanto, há, com certeza, apenas uma coisa em minha vida na qual eu não me fio a 95% de confiabilidade para tomar como um fato e cujo fundamento é isento da necessidade de qualquer validação experimental ou estatística: A crença em uma verdade, que é minha, a qual não se há instrumentos para prová-la, nem se há a necessidade para tanto, porque ela transcende o que é físico. Somente quem, em qualquer nível da cadeia das gerações, trilhou o meu caminho ou passou pelo que eu passei, poderá com razão me julgar com base na minha crença. Ainda porque, até para o incrédulo, sendo apenas uma minúscula fração de um todo inconcebível, seria uma estupidez imensa, uma arrogância sem sentido e uma ridicularização de si próprio como ser pensante, fechar a porta para qualquer substrato desconhecido que não responde ao toque de meras mãos. Essa verdade é Deus. Assim, antes de tudo, eu agradeço ao único fator que possibilitou com toda a certeza, a realização deste trabalho: Muito obrigado, Deus!

Meu muito obrigado...

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, pela oportunidade, confiança, ótimas conversas e toda a atenção e competência dedicados a este trabalho;

Aos meus amigos do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), Ana, Andréia, Angela, Carolina, Eduardo, Fernanda Barros, Fernanda Neves, Filipe, Juliana, Josiel, Marissa, Morgana, Paulo, Priscila, Samantha e Tuane, por todo o apoio, companheirismo e todas as boas conversas e risadas, na Universidade e fora dela;

Ao seu Nivaldo, secretário do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, que desde o primeiro contato não mediu esforços para a resolução dos problemas, prestando todo o seu apoio e dedicação;

À Prof. Dra. Andreza Fabro de Bem, e à Daiane, Jade e Jadna do Departamento de Bioquímica, por aceitarem a parceria nessa empreitada, pelas dicas e orientações, pelo suporte

nas análises bioquímicas e por fornecer os animais nocautes para este estudo, pois sem isso nada seria possível;

Ao Prof. Dr. Claudio Da Cunha e à Gisele de Oliveira Guaita do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) pela parceria e o profissionalismo nas medições das monoaminas por HPLC e por todo o apoio prestado;

À Sheila e a todos os demais secretários, técnicos, professores e colegas do Departamento de Farmacologia, por todo o suporte prestado durante as correrias do dia-a-dia;

A todos os professores e colegas dos Programas de Pós-Graduação em Neurociências, Farmacologia, Bioquímica e Biologia celular e do Desenvolvimento, que não estão citados aqui, pela amizade e que me acompanham ao longo desses quase dois anos de grandes descobertas, aulas extraordinárias e memoráveis momentos de descontração, discussões científicas, angústias e alegrias;

Aos meus pais, Severino e Maria – a quem sempre prestarei infinita gratidão – e a todos os meus familiares e amigos, por toda a generosidade e incomensurável apoio desde que me mudei para Florianópolis. E por compreenderem as minhas ausências e me incentivarem em minhas batalhas;

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida, a qual forneceu o mantimento financeiro pessoal que possibilitou a realização deste trabalho;

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UFSC e às agências CNPq, FAPESC e FINEP que propiciaram os subsídios necessários para a obtenção dos recursos e serviços que mantiveram este trabalho.

Muito obrigado!



*“I watched a dandelion lose its mind in the wind
and when it did, it scattered a thousand seeds.”*

- Andrea Gibson

RESUMO

A cafeína é uma substância que pode alterar o funcionamento do sistema nervoso central e influenciar a cognição em mamíferos, incluindo os diferentes tipos de memória. Considerada uma substância estimulante, a cafeína é ingerida diariamente por milhões de pessoas podendo afetar estados atencionais e de humor. Estudos epidemiológicos têm mostrado efeitos benéficos do consumo crônico de cafeína na prevenção ou retardo de patologias que causam déficits cognitivos e locomotores como o comprometimento cognitivo leve (MCI) e doença de Alzheimer. A deficiência do receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR), responsável pelo desenvolvimento da hipercolesterolemia familiar, tem sido associada a déficits cognitivos e a diferentes alterações bioquímicas e comportamentais em roedores. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da administração crônica de cafeína (10 mg/kg) via oral, em dose única diária por 21 dias sobre as funções motoras, cognitivas e de emocionalidade, bem como de alterações bioquímicas, em camundongos nocautes (LDLR^{-/-}) e selvagens para o LDLR de duas idades diferentes (3 e 8 meses). Os resultados obtidos revelam prejuízos na memória social de curto prazo, na memória espacial e memória aversiva de longo prazo dependentes da idade e independentes do tratamento ou linhagem, sendo que os camundongos LDLR^{-/-} exibiram comportamento do tipo depressivo sem alterações causadas pelo tratamento com a cafeína. O presente trabalho também corrobora dados prévios da literatura evidenciando uma hiperlocomoção nos camundongos LDLR^{-/-}, sendo que o tratamento com cafeína atenuou o aumento na atividade locomotora nos animais LDLR^{-/-} com 8 meses de idade, sem alterar o perfil lipídico ou parâmetros relacionados à ansiedade. Estes resultados indicam que a hiperlocomoção não é decorrente de níveis elevados de colesterol, evidenciando que o LDLR desempenha um papel no controle da função motora independentemente dos níveis lipídicos.

Palavras-chave: Cafeína; Memória; Hiperlocomoção; Hipercolesterolemia; LDLR^{-/-}; Receptor de lipoproteínas de baixa densidade; Campo aberto; atividade locomotora.

ABSTRACT

Caffeine is a compound that can affect the functioning of the central nervous system and cognition in mammals, including different types of memory. Caffeine is considered a stimulant substance and it is consumed daily by millions of people leading to effects on attention and mood. Epidemiological studies have shown beneficial effects of chronic consumption of caffeine to prevent or delay diseases that cause cognitive and motor deficits such as mild cognitive impairment (MCI) and Alzheimer's disease. Deficiencies on the Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR), responsible for the development of familial hypercholesterolemia, have been associated with cognitive deficits and biochemical and behavioral alterations in rodents. The objective of this study was to investigate the effects of chronic treatment of caffeine (10 mg/kg, oral route) once a day during 21 days on motor, cognitive and emotional functions as well as biochemical changes on LDLR knockout mice (LDLR^{-/-}) and wild-type mice with 3 and 8 months-old. The results of this study show age-related impairments in the social short-term memory, spatial memory and long-term aversive memory independent of treatment or strain. LDLR^{-/-} mice have exhibited depressive-like behaviors that were not altered by caffeine treatment. This study also corroborates previous data showing an increased locomotor activity of LDLR^{-/-} mice that was attenuated by caffeine in LDLR^{-/-} 8 month-old mice. Interestingly, it was revealed that these effects of caffeine on motor function were independent of anxiety-related responses and hypercholesterolemic profile of LDLR^{-/-} mice. Therefore, these findings indicate that the LDLR can play a role in the modulation of locomotor activity regardless of lipid levels.

Keywords: Caffeine; Memory; Hyperlocomotion; Hypercholesterolemia; LDLR^{-/-}; Low-Density Lipoprotein Receptor; Open field; Locomotor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural química da cafeína (1,3,7-trimetilxantina)	03
Figura 2. Receptores para adenosina acoplados a proteínas G inibitórias (A_1) e estimulatórias (A_{2A})	04
Figura 3. Desenho esquemático do cronograma experimental	18
Figura 4. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) na distância percorrida (m) e velocidade média (m/s) durante 5 min do teste do campo aberto nos animais das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 meses e 8 meses de idade	28
Figura 5. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) no número de entradas e tempo de permanência (s) na área central do campo aberto durante 5 min em animais das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 meses e 8 meses de idade	30
Figura 6. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre parâmetros de ansiedade em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 meses de idade avaliados no labirinto em cruz elevado	31
Figura 7. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a memória espacial de curto prazo de animais das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 8 meses de idade avaliada no teste de alternância espontânea ..	33
Figura 8. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a memória social de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 8 meses de idade	34
Figura 9. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a latência média de escape no dia 1 e no dia 2 no labirinto aquático de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 meses e 8 meses de idade ..	36
Figura 10. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) no desempenho de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 meses de idade no labirinto aquático	37
Figura 11. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) no desempenho de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 8 meses de idade no labirinto aquático	38
Figura 12. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a memória aversiva de longo prazo de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 e 8 meses de idade avaliados na esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	39

- Figura 13.** Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre comportamentos do tipo depressivo de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade avaliados no teste da suspensão pela cauda 40
- Figura 14.** Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 8 meses de idade 43
- Figura 15.** Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade 44
- Figura 16.** Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a concentração de dopamina (DA) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade 45
- Figura 17.** Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a concentração de noradrenalina (NA) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade 46
- Figura 18.** Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a concentração de serotonina (5-HT) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil lipídico de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 e 8 meses de idade com os níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL e triglicerídeos	41
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina

A β – Peptídeo beta-amiloide

AChE – Acetilcolinesterase

apoB100 – Apolipoproteína B100

apoE – Apolipoproteína E

BHE – Barreira hematoencefálica

BrdU – 5-bromo-2'-deoxiuridina

CAF – Cafeína

DA – Dopamina

EDTA – Ácido etilenodiaminatetraacético

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LDLR – Receptor de lipoproteína de baixa densidade

LDLR^{-/-} – Camundongo nocaute para o receptor de lipoproteína de baixa densidade

MCI – Prejuízo/Comprometimento cognitivo leve (do inglês “*mild cognitive impairment*”)

mRNA – RNA mensageiro (do inglês “*messenger RNA*”)

NA – Noradrenalina

SNC – Sistema nervoso central

TH – Tirosina hidroxilase

v. o. – Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Uma introdução sobre cognição	01
1.2. Cafeína e sistema nervoso central	03
1.3. Hipercolesterolemia e modelo animal	08
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. ANIMAIS	16
3.2. TRATAMENTO	16
3.3. DESENHO EXPERIMENTAL	17
3.4. TESTES COMPORTAMENTAIS	19
3.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	23
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4. RESULTADOS	27
4.1. TESTES COMPORTAMENTAIS	27
4.1.1. Efeitos do tratamento com cafeína na atividade locomotora de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 e 8 meses de idade	27

4.1.2. Efeitos do tratamento com cafeína sobre parâmetros de ansiedade em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 e 8 meses de idade	29
4.1.3. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a memória de curta duração de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 8 meses de idade	33
4.1.4. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a memória espacial em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 e 8 meses de idade	35
4.1.5. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a memória aversiva em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 e 8 meses de idade	39
4.1.6. Efeitos do tratamento com cafeína sobre comportamentos do tipo depressivo em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 e 8 meses de idade	40
4.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	41
4.2.1. Efeitos do tratamento com cafeína sobre o perfil lipídico em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 e 8 meses de idade	41
4.2.2. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 e 8 meses de idade	43
4.2.3. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 e 8 meses de idade	44
4.2.4. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a concentração de monoaminas e seus metabólitos no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr ^{-/-} com 3 e 8 meses de idade	45
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Uma introdução sobre cognição

O conceito de cognição (termo derivado da palavra latina *cognoscere*, significando "conhecer", "saber" ou "reconhecer") é uma noção complexa que pode até ser polissêmica, mas refere-se à capacidade de processamento de informações, aplicação de conhecimento e mudança de preferência. A cognição envolve, pelo menos, a memória, a atenção, funções executivas, percepção, funções psicomotoras e linguagem. Cada um destes aspectos da cognição representam entidades complexas. A atenção pode ser uma função seletiva, dividida ou sustentada. A percepção inclui vários estágios de processamento que permitem o reconhecimento de objetos e características em diferentes modalidades (visual, auditiva e tátil). Funções executivas envolvem aspectos tais como raciocínio, planejamento, avaliação e pensamento estratégico. A linguagem está envolvida com expressões verbais, vocabulário, fluência e compreensão da linguagem. Funções psicomotoras estão relacionadas à programação e execução motora. Sendo que todas estas funções, inclusive a memória, sofrem influências de vários fatores, como o estado de humor, motivação, bem-estar físico e nível de agitação, que por sua vez, refletem em diferentes estados de alerta e atenção (IZQUIERDO, 2002; NEHLIG, 2010 a).

A memória é uma capacidade biológica dos indivíduos que inclui diferentes etapas: aquisição, consolidação (e reconsolidação), evocação e extinção de informações. A aquisição é chamada também de aprendizagem e é crítica para a formação de lembranças (IZQUIERDO, 2002). A aprendizagem e a memória são capacidades cognitivas que podem ser avaliadas através de diferentes testes comportamentais, específicos para diferentes representações ou modalidades das mesmas. Sendo que as memórias podem ser classificadas quanto a sua duração em memórias de curto prazo e memórias de longo prazo. As memórias de curto prazo armazenam informações durante breves intervalos de tempo, que permite a evocação destas memórias mesmo enquanto as memórias de longo prazo estão sendo consolidadas (IZQUIERDO & MEDINA, 1991).

A memória de trabalho permite a habilidade de manter e manipular informações através de um processo de guiá-las em complexas sequências de execução de tarefas

cognitivas (GLADE, 2010). Pode ser descrita como um sistema multicomponente composto por um componente executivo constituído por um número de processos que fornecem controle em tempo real sobre outros componentes da memória de trabalho e outras habilidades cognitivas. Dois dos subcomponentes são de domínio específico, proporcionando a capacidade de manter informações fonológicas e visuo-espaciais independentes. Outro subcomponente permite a integração das informações em representações multimodais complexas vinculando a memória de trabalho à memória de longo prazo, sendo que neste caso, a região cerebral do hipocampo desempenha um papel importante nesta função, além de proporcionar à formação de um mapa espacial a partir de informações ambientais (NEHLIG, 2010 a).

As memórias de longo prazo permitem o armazenamento de grandes quantidades de informação durante longos períodos de tempo que podem se estender por semanas, meses e até anos. As memórias de trabalho e de longo prazo podem ser acessadas conscientemente durante a execução de tarefas, constituindo-se em memórias explícitas. Por outro lado, memórias implícitas são representações de memória que não podem ser acessadas de maneira consciente. Estas podem incluir procedimentos motores como escrever, andar de bicicleta ou conduzir precisos passos de dança de forma inconsciente enquanto mantém um diálogo consciente e racional com o seu par de dança (IZQUIERDO, 2002).

1.2. Cafeína e sistema nervoso central

A cognição, juntamente com os diferentes tipos de memória, pode ser influenciada por diversas substâncias que agem sobre os componentes físicos e químicos subjacentes a estes processos no sistema nervoso central (SNC) e refletir em diferentes respostas comportamentais. A cafeína é uma dessas substâncias, sendo reconhecida como a droga psicoativa mais consumida no mundo (SOLINAS et al., 2002), estando presente em muitos alimentos e bebidas como o café, chás, chocolate, guaraná, mate, refrigerantes e bebidas energéticas (CLARKSON, 1993; BARONE & ROBERTS, 1996; SLAVIN & JOENSEN, 1995). A cafeína é um alcaloide do grupo das xantinas designado quimicamente como 1,3,7-trimetilxantina (ver Figura 1) que após absorvida no trato gastrointestinal é metabolizada no fígado e, posteriormente, nos rins e no encéfalo (DAVIS et al., 2003).

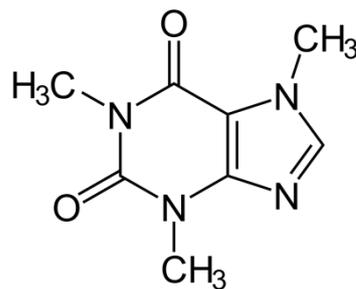


Figura 1. Fórmula estrutural química da cafeína (1,3,7-trimetilxantina). Nomenclatura IUPAC: 1,3,7-trimetil-1*H*-purino-2,6(3*H*,7*H*)-diona.

No SNC, a cafeína age de maneira não seletiva em diversos alvos moleculares, apresentando diferentes mecanismos de ação que incluem a inibição da enzima fosfodiesterase, o bloqueio do receptor GABA_A, o aumento do influxo de cálcio no meio intracelular e o antagonismo dos receptores para adenosina (FREDHOLM et al., 1999).

Vem sendo demonstrado que a maioria dos efeitos da cafeína no SNC são decorrentes do antagonismo dos receptores para adenosina, isso porque os outros efeitos da cafeína, descritos acima, requerem concentrações muito superiores às aquelas normalmente utilizadas experimentalmente ou ingeridas na dieta humana (em torno de 250 mg por dia) (FREDHOLM

et al., 1999). Assim, o sistema adenosinérgico parece ser mais sensível às ações da cafeína, onde ela age como um antagonista competitivo não seletivo dos receptores para adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3), que pertencem à família de proteínas acopladas a proteínas G. A cafeína se liga com maior afinidade aos receptores adenosinérgicos do tipo A_1 (acoplados a proteína G inibitória) e A_{2A} (acoplados a proteína G estimulatória) sendo que estes representam os receptores para adenosina mais amplamente expressos no encéfalo de mamíferos (Figura 2) (FREDHOLM et al., 2001).

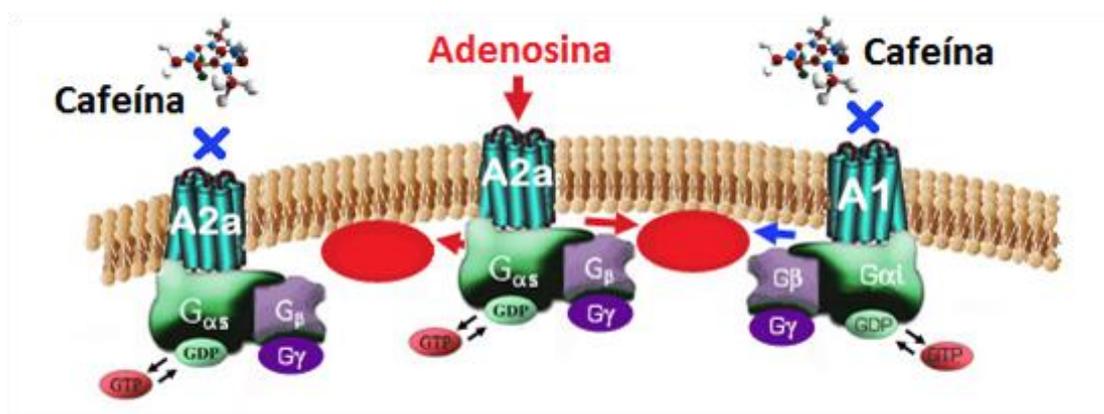


Figura 2. Receptores para adenosina acoplados a proteínas G inibitórias (A_1) e estimulatórias (A_{2A}).

Embora a adenosina não seja considerada um neurotransmissor por não ser armazenada em vesículas sinápticas (SEBASTIÃO & RIBEIRO, 2009), conforme Cunha (2005), a adenosina é um importante componente regulador da homeostasia sináptica e está presente em todas as células do SNC, sendo considerada um neuromodulador. A adenosina é uma molécula da classe das purinas, é originada endogenamente através de uma série de rotas metabólicas, que incluem o metabolismo de nucleotídeos, nucleosídeos e o metabolismo de aminoácidos que contém sulfeto (CUNHA, 2005).

A adenosina pode agir no espaço sináptico inibindo ou facilitando, através dos receptores para adenosina, a liberação de neurotransmissores. Em nível pré-sináptico, a adenosina pode inibir (através da ativação de receptores A_1) ou facilitar (através da ativação de receptores A_{2A}) a liberação de neurotransmissores. Em nível pós-sináptico, a adenosina pode interagir direta ou indiretamente afetando as ações de diferentes neurotransmissores (SEBASTIÃO & RIBEIRO, 2009). Permanecem escassos os trabalhos investigando o papel

dos receptores adenosinérgicos A_{2B} e A_3 . Enquanto os receptores A_3 possuem alta afinidade para a adenosina e apresentam um nível de expressão moderado no hipocampo e no cerebelo (para humanos), o receptor A_{2B} possui baixa afinidade pela adenosina e parece estar mais envolvido em condições patológicas onde ocorre um aumento nos níveis de adenosina. Devido ao fato do receptor A_1 ser mais amplamente expresso em diversas regiões do encéfalo, as ações da adenosina no SNC são principalmente decorrentes da sua interação com esses receptores. Ao ativar os receptores A_1 na pré-sinapse, a adenosina desencadeia uma inibição tônica da liberação de neurotransmissores excitatórios, como por exemplo, o glutamato (CUNHA, 2005). De acordo com Rossi et al. (2009), tratamentos crônicos com cafeína resultam em tolerância por dessensibilização dos receptores A_1 , de modo que os efeitos sobre os receptores A_{2A} prevalecem nas condições de uso crônico. Já o tratamento agudo com a cafeína tende a afetar predominantemente os receptores A_1 (ROSSI et al., 2009).

Além disso, sabe-se também que os receptores para adenosina podem formar heterômeros com outros tipos de receptores ou passarem por mudanças em suas vias de transdução de sinal de modo a interagir com outros sistemas de neurotransmissão (SEBASTIÃO & RIBEIRO, 2009).

A cafeína pode aumentar agudamente a eficiência do funcionamento de redes neuronais no córtex cerebral humano. Por exemplo, 20 minutos após o consumo de 100 mg de cafeína e durante a execução de uma tarefa que requer o uso da memória de trabalho, imagens de ressonância magnética evidenciam aumento na atividade neuronal do encéfalo em áreas associadas com funções cognitivas que demandam atenção, ativando principalmente áreas do córtex pré-frontal (GLADE, 2010). Isso produz uma espécie de aumento na "energia mental", observado por um aumento na capacidade funcional de se envolver em tarefas cognitivas, resultando em aumento da vigilância, da atenção, da capacidade de concentração e capacidade de escolher corretamente entre as alternativas (julgamento). Desse modo, a cafeína poderia indiretamente contribuir com a formação e conservação de informações através de uma facilitação durante o processo de aquisição da memória (aprendizagem) durante a interação indivíduo-ambiente (GLADE, 2010).

A maioria dos estudos investigando os efeitos da cafeína sobre a cognição demonstra os seus efeitos agudos positivos sobre a atenção e o aumento da sensação de alerta. Por exemplo, o primeiro estudo a ser publicado relatando efeitos positivos da cafeína na cognição e em funções motoras ocorreu em 1912, por Hollingworth, que demonstrou que após o

consumo de cafeína, o tempo de reação e de realização de cálculos matemáticos diminuía enquanto que a firmeza das mãos do indivíduo aumentava (HOLLINGWORTH, 1912).

Desde então, muitos trabalhos foram realizados almejando explorar os efeitos da cafeína na cognição (para revisão ver TAKAHASHI et al., 2008), sendo que a maioria desses estudos têm confirmado os achados descritos por Hollingworth (1912), de que, ao menos quanto à administração aguda, o grande benefício da cafeína na cognição está relacionado à melhoria de aspectos da atenção e humor. Doses moderadas de cafeína podem aumentar a sensação de bem estar, se forem consumidas durante situações estressantes (ROSSI et al., 2009). No entanto, doses elevadas de cafeína (em torno de 400 mg ou mais, para humanos) estão relacionadas a sintomas de estados de ansiedade intensa, como o aumento da frequência cardíaca ligado ao aumento da impulsividade e a déficits no desempenho em testes atencionais (NEHLIG, 2010 b).

Por outro lado, o consumo crônico de cafeína continua sendo um dos prováveis candidatos em reverter comprometimentos e prejuízos da memória associados a diferentes condições, sendo capaz de oferecer proteção contra prejuízos cognitivos em modelos experimentais de envelhecimento, das doenças de Parkinson e de Alzheimer, e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), um modelo animal do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (MOHAMMAD et al., 1993; PREDIGER et al., 2005 a, b; CUNHA, 2008; TAKAHASHI et al., 2008; PANDOLFO et al., 2013).

Para Nehlig (2010 b), a cafeína não é considerada uma substância aditiva. Seus resultados indicam que a cafeína não desencadeia aumentos na liberação ou na taxa metabólica da dopamina em áreas do cérebro envolvidas no reforço e recompensa ao consumo. Em outro estudo (DA SILVA et al., 2005), quando administrada no período gestacional ou após o nascimento (até 21 dias de idade), a cafeína apresentou efeitos fisiológicos atribuídos à modulações no neurodesenvolvimento de ratos. A cafeína foi capaz de diminuir a hiperlocomoção induzida pela droga MK-801 em ratos, sendo que esses efeitos foram persistentes na vida adulta, indicando que a administração crônica da cafeína durante os estágios iniciais do desenvolvimento pode ser responsável por mudanças duradouras no SNC. Tais mudanças podem estar relacionadas a um déficit na neuromodulação exercida pela adenosina durante as fases iniciais do desenvolvimento do SNC em que há intensa formação de conexões neurais, sendo que uma alteração nos níveis inibitórios da adenosina nessa condição poderia facilitar a liberação de diversos neurotransmissores que causariam os efeitos relatados (DA SILVA et al., 2005).

Já o tratamento crônico com cafeína em fêmeas prenhas e em animais no período pré-puberdade (dia pós-natal 25 ao 38) melhorou déficits de reconhecimento de objeto em ratos SHR e prejudicou o reconhecimento de objeto em ratos WIS adultos (PIRES et al., 2010). E mais recentemente, um estudo demonstrou que a administração oral de cafeína (0,3 g/L) em roedores durante a gravidez e a lactação pode ter efeitos adversos sobre o desenvolvimento neural observado por atrasos na migração e inserção de neurônios Gabaérgicos nos circuitos do hipocampo, e como consequência, prejudicando a memória espacial e memória de reconhecimento, sem causar modificações evidentes na atividade locomotora ou de comportamentos relacionados à ansiedade (SILVA et al., 2013).

De maneira interessante, Borota et al. (2014) trouxeram à tona recentemente evidências que suportam um benefício da ingestão de cafeína na consolidação de memórias de longo prazo em humanos (BOROTA et al., 2014). Neste estudo foi constatado que uma dose de 200 mg de cafeína, administrada após uma sessão de aprendizado, aumenta a capacidade de memorizar o conteúdo anteriormente aprendido. Este estudo é importante porque foi o primeiro a evidenciar efeitos da cafeína sobre a consolidação da memória de longo prazo, administrando a cafeína após o desempenho (e não antes) de uma tarefa de aprendizagem. Trabalhos anteriores com animais de laboratório já haviam demonstrado que a cafeína apresenta efeitos sobre a memória de curto prazo, sendo que nesses estudos, a cafeína foi administrada antes da sessão de aprendizado, o que torna difícil dissociar os efeitos sobre a memória de outros possíveis efeitos agudos, como o aumento da atenção, mudanças de humor e aumento da velocidade de processamento neural (TAKAHASHI et al., 2008; BOROTA et al., 2014).

Por outro lado, estudos epidemiológicos têm mostrado que indivíduos hipercolesterolêmicos são mais propensos a desenvolver a doença de Alzheimer (EVANS et al., 2000; YAFFE et al., 2002). Assim sendo, a hipercolesterolemia pode representar um fator contribuinte na patogênese de doenças neurodegenerativas. Considerando esse quadro, evidências têm sugerido que o consumo de café reduz o risco de declínio cognitivo, demência e doença de Alzheimer e que a cafeína é considerada o componente ativo associado a esses efeitos benéficos (MAIA & DE MENDONCA, 2002; VAN GELDER et al., 2007).

1.3. Hipercolesterolemia e modelo animal

A hipercolesterolemia se caracteriza pela presença de níveis elevados de colesterol no plasma sanguíneo. Os níveis considerados são acima de 200 mg/dL para humanos adultos, (segundo o instituto americano *The National Heart, Lung, and Blood Institute*, 2013) , bem como, uma elevação isolada igual ou superior a 160 mg/dL do colesterol associado às LDL (de acordo com a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia) (XAVIER et al., 2013). Uma vez que se constitui num dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares tais como a aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, hipertensão e complicações de saúde e outras doenças que são decorrentes destas, a hipercolesterolemia é um motivo de preocupação para muitos profissionais de saúde em todo o mundo (ROBBINS, 1991; GERHARDT & GALLO, 1998; GOMES et al., 1998).

A hipercolesterolemia pode ser resultado de características culturais ou hábitos de alimentação, distúrbios alimentares ou também resultado de características fisiológicas, principalmente quanto à metabolização lipídica, como é o caso da hipercolesterolemia familiar, que é uma doença genética autossômica comum causada por uma alteração no gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr). Esse receptor celular está ancorado à membrana plasmática sendo capaz de reduzir os níveis lipídicos séricos, por internalizar a partir da matriz extracelular, o colesterol e outros lipídeos associados com a lipoproteína de baixa densidade (LDL) que se caracteriza por ser uma classe de lipoproteína de transporte rica em colesterol (HOBBS et al., 1992). Além de colesterol, a LDL apresenta conteúdo residual de triglicérides e é composta de uma única apolipoproteína, a apo B100 (XAVIER et al., 2013).

Sabe-se que as partículas de LDL são capturadas através de células hepáticas ou periféricas por meio dos receptores de LDL (LDLR). No interior das células, o colesterol livre pode ser esterificado para depósito por ação da enzima acil-CoA:colesteril aciltransferase (XAVIER et al., 2013). O LDLR é um receptor altamente conservado evolutivamente e foi o primeiro membro identificado de uma grande família de proteínas transmembrana. O LDLR é capaz de participar na mediação de sinalização através de uma variedade de ligantes secretados, além de regular o transporte de colesterol via apolipoproteínas, como a apolipoproteína B100 (apo B100) a apolipoproteína E (apoE) (HERZ et al., 2000). Análises

do gene LDLr em humanos hipercolesterolêmicos levou à identificação de mais de 1100 diferentes mutações que incluem deleções, mutações de ponto e inserções (GOLDSTEIN & BROWN, 2009). Entre as populações ocidentais, a hipercolesterolemia familiar afeta cerca de 1 em cada 500 indivíduos e se caracteriza por níveis séricos elevados de colesterol LDL relacionados a xantomas tendinosos e a doença arterial coronariana prematura (GOLDSTEIN & BROWN, 1989).

Reconhecido como um modelo de hipercolesterolemia familiar humana, o camundongo nocaute para o gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr^{-/-}), descrito em 1993 por Ishibashi e colaboradores, constitui uma linhagem de roedores que além de desenvolver hipercolesterolemia espontaneamente, exibe diversas alterações bioquímicas e comportamentais (ZADELAAR et al., 2007). Ao longo das últimas duas décadas, os camundongos LDLr^{-/-} vêm sendo utilizados para a elucidação acerca do metabolismo do colesterol e outros lipídeos, sendo que a deficiência do LDLR nesses animais tem sido associado a déficits de aprendizagem e memória em comparação aos animais selvagens (LDLr^{+/+}) (MULDER et al., 2004).

Acredita-se que a formação de novos neurônios e a plasticidade sináptica desempenham um papel importante na aprendizagem e na memória. Portanto, a proliferação celular diminuída e a formação de sinapses podem estar subjacentes a determinados prejuízos cognitivos (MULDER et al., 2004). Dado que o colesterol é necessário para a proliferação celular, supõe-se que uma redução na absorção celular de colesterol causada pela deficiência do LDLR pode ser a base para uma proliferação celular reduzida. Isso foi evidenciado em 2007 por um estudo conduzido por Mulder e colaboradores onde se verificou que camundongos LDLr^{-/-} exibiam uma redução na proliferação de células do hipocampo (avaliada através da marcação com BrdU), em comparação à camundongos controles do tipo selvagem. Além disso, o número de botões pré-sinápticos imunorreativos à sinaptofisina nas regiões CA1 e giro denteado do hipocampo foi inferior nos camundongos LDLr^{-/-} quando comparados aos camundongos LDLr^{+/+}. Por fim, experimentos *in vitro* mostraram que a atividade do LDLR é aumentada quando o crescimento celular é também aumentado pela indução de suplemento de N2. Isto evidencia um papel do LDLR também no crescimento dendrítico (MULDER et al., 2007). Além disso, as estatinas (fármacos utilizados no tratamento da hipercolesterolemia e na prevenção da aterosclerose) são capazes de aumentar o número de receptores de LDL em astrócitos (PAVLOV et al., 1995). Neste sentido, tem sido

demonstrado que as estatinas aumentam a neurogênese e os níveis de sinaptofisina no encéfalo (CHEN et al., 2003; LONGO et al., 2006).

O LDLR é muito expresso no fígado (BROWN & GOLDSTEIN, 1986). Ele medeia a interação e a internalização celular da apolipoproteína E (apoE) e também da apolipoproteína B100 (apoB100). Através de vesículas endocíticas revestidas por clatrina, o receptor é internalizado estando ligado à apolipoproteína, sendo que esta entra em sua via de catabolismo e o receptor é reciclado retornando à membrana plasmática (INNERARITY & MAHLEY, 1978). Embora as funções periféricas do LDLR tenham sido investigadas extensivamente, ainda são escassos os trabalhos investigando as suas funções no SNC (HERZ & BOCK, 2002). O único ligante conhecido para o LDLR no encéfalo é a apoE, considerando que a apoB100 não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), em contrapartida, a apoE não é sintetizada no encéfalo (BROWN & GOLDSTEIN, 1986). Assim, a relação entre estas duas biomoléculas pode ter um papel chave no metabolismo lipídico no SNC.

No SNC, o LDLR é encontrado predominantemente em astrócitos, mas também em outros tipos de células incluindo neurônios (BEFFERT et al., 1998). Segundo Dietschy & Turley (2004), embora os neurônios possam sintetizar o colesterol, eles dependem principalmente do fornecimento de colesterol pelos astrócitos. Estes secretam colesterol ao meio extracelular associados à ApoE e esse suprimento de colesterol é utilizado pelos neurônios para a sinaptogênese e o crescimento axonal. No hipocampo, o LDLR é expresso principalmente na camada piramidal das regiões CA1 e CA3, e está presente em regiões colinérgicas basais do prosencéfalo. Além disso, ele é encontrado em células endoteliais dos microcapilares encefálicos (MULDER et al., 2004).

Diferentemente de humanos, a deficiência do LDLR em camundongos leva a um aumento menos marcante nos níveis de colesterol plasmático, em cerca de duas vezes (ISHIBASHI et al., 1993), ao passo que a concentração encefálica de colesterol e sua taxa de síntese permanecem inalterados (OSONO et al., 1995). No caso da deficiência do LDLR, como observado nos camundongos nocautes para este receptor, o colesterol pode ser captado pelos neurônios por via da proteína relacionada ao receptor de lipoproteína 1 (LRP1) que é o único outro membro da família do LDLR, conhecido até o momento, especializado em carrear LDL no SNC. Porém, os camundongos nocautes homozigotos para o LDL, mesmo expressando LRP1 funcional, apresentam uma diminuição na absorção do colesterol pelos neurônios, verificado por um aumento nos níveis de apoE extracelular disponíveis, e esse fato está ligado a uma redução na plasticidade neuronal (MULDER et al., 2007).

O LDLR possui uma afinidade para a apoE, e essa afinidade aumenta conforme o decréscimo do tamanho de seu complexo apolipoprotéico, como descrito anteriormente por Rensen et al. (1997). Dessa forma, a interação entre LDLR e apoE no SNC pode ser crucial para diferentes funções fisiológicas. A importância da relação entre LDLR e apoE fica mais clara quando consideramos que, semelhante aos camundongos LDLR^{-/-}, camundongos nocautes para apoE, apresentam uma diminuição no número de botões pré-sinápticos do hipocampo e do neocórtex conforme o aumento da idade (MASLIAH et al., 1995). Em humanos, uma das três isoformas comuns de apoE, a apoE4, é um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (CORDER et al., 1993).

Em adição, foi evidenciado em humanos que níveis séricos elevados de colesterol na vida adulta podem ser responsáveis por declínio cognitivo ou por comprometimento cognitivo leve (MCI) (KIVIPELTO et al., 2001). Apoiando isso, segundo Whitmer et al. (2005), níveis séricos elevados de colesterol em humanos na vida adulta podem resultar em MCI bem como no desenvolvimento de demência.

Do ponto de vista experimental, isso é corroborado quando Cao et al. (2006) evidencia que a deficiência do LDLR em um modelo animal transgênico já bem estabelecido da doença de Alzheimer (camundongos Tg2576) agravou a deposição do peptídeo beta-amiloide (A β) e aumentou os déficits de aprendizagem nesses animais. Estes resultados sugerem que o LDLR pode desempenhar um papel nos processos de aprendizagem e de amiloidogênese relacionados à doença de Alzheimer em humanos. De acordo com esta hipótese, Kim et al. (2009) desenvolveram uma série de camundongos transgênicos que superexpressam o LDLR no encéfalo e descobriram que os níveis de apoE nesses animais diminuíram em 50-90%. Somando-se a isso, a superexpressão do LDLR reduziu significativamente a agregação do peptídeo A β e aumentou a sua remoção do espaço extracelular. Além disso, as respostas neuroinflamatórias associadas à formação das placas senis também foram atenuadas nos animais com superexpressão do LDLR (KIM et al., 2009). Isso vai de encontro com o que relatou Igbavboa et al. (1997), de que variações na expressão do LDLR podem afetar a progressão da doença de Alzheimer através da modulação da distribuição intracelular de colesterol.

O nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo nos últimos anos uma série de estudos com camundongos LDLR^{-/-}, sendo que já foi demonstrado a presença de diversas alterações bioquímicas e comportamentais acompanhadas de déficits cognitivos nesses animais (DE OLIVEIRA et al., 2011, 2014; MOREIRA et al., 2012 a; 2013). Os resultados desses estudos

corroboram dados provenientes de estudos epidemiológicos que têm indicado que a hipercolesterolemia na meia-idade é um fator de risco para o desenvolvimento de MCI ou o posterior desenvolvimento da doença de Alzheimer (MOREIRA et al., 2013, 2014). Em adição, foi evidenciado que camundongos LDLr^{-/-} são mais sensíveis a neurotoxicidade induzida pela infusão intracerebroventricular do peptídeo Aβ1-40 (DE OLIVEIRA et al., 2014).

Foi também demonstrado que há uma correlação positiva entre níveis elevados de colesterol e prejuízos cognitivos em camundongos LDLr^{-/-} apresentando disfunção mitocondrial e estresse oxidativo no SNC (DE OLIVEIRA et al., 2011). Esses animais exibiram prejuízos no desempenho de tarefas avaliando memórias espacial e de trabalho. Além disso, apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de glutatona, e também um desequilíbrio na atividade enzimática de remoção de peróxidos relacionados às enzimas glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) no córtex cerebral, levando também em consideração que a hipercolesterolemia induz estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), por enzimas tais como as NADPH-oxidases e as xantinas oxidases (MUNZEL et al., 2010).

Nosso grupo também observou um aumento em torno de 40% nos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são produtos de peroxidação lipídica, no córtex e no hipocampo de camundongos LDLr^{-/-} (DE OLIVEIRA et al., 2011). Moreira et al. (2012, a), mostraram um declínio cognitivo nos camundongos LDLr^{-/-} relacionado com a idade, evidenciando que esses animais acabam desenvolvendo prejuízos precoces nas memórias de trabalho, espacial e de procedimento, sem que hajam alterações na função motora. Neste mesmo estudo, os prejuízos cognitivos foram acompanhados por desequilíbrio antioxidante e ainda por um aumento significativo na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina no espaço sináptico em colina e ácido acético, no córtex pré-frontal dos camundongos LDLr^{-/-}, indicando a presença de alterações na transmissão colinérgica em áreas do cérebro associadas com processos de aprendizagem e memória, em particular no córtex pré-frontal (MOREIRA et al. 2012, a).

Outra alteração comportamental relevante nos camundongos LDLr^{-/-} relatada por outro grupo de pesquisadores foi a hiperlocomoção. Este comportamento foi investigado e descrito por Elder et al. (2008), que observaram uma atividade locomotora aumentada nos camundongos LDLr^{-/-} que não é observada em suas contrapartes selvagens. Elder e sua equipe

trataram camundongos machos de 2 meses de idade da linhagem LDLr^{-/-} e da linhagem C57BL/6 (LDLr^{+/+}) com dietas padrões ou ricas em colesterol. Foi observado que os camundongos LDLr^{-/-} passaram mais tempo em movimento e percorreram maiores distâncias no teste do campo aberto do que camundongos C57BL/6. Não foram observadas diferenças físicas (tamanho, peso corporal, etc.) evidentes entre os grupos testados de ambas as linhagens e, em geral, os LDLr^{-/-} não apresentaram déficits em funções sensoriais ou motoras em comparação com os C57BL/6. Nesse estudo, o padrão de locomoção aumentada observada nos camundongos LDLr^{-/-} foi independentemente da dieta (ELDER et al., 2008).

Dessa forma, considerando as diversas alterações comportamentais e bioquímicas apresentadas pelos camundongos LDLr^{-/-} e os escassos trabalhos investigando as funções do LDLR no SNC (HERZ & BOCK, 2002), estes animais se tornam não apenas um modelo útil no estudo da hipercolesterolemia familiar humana (ZADELAAR et al., 2007), mas também, uma ferramenta de investigação dos processos de aprendizagem e memória e de substâncias capazes de modificar estes processos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos do tratamento crônico com cafeína sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas em camundongos LDLr^{-/-}, utilizados como um modelo experimental da hipercolesterolemia familiar humana.

2.2. Objetivos específicos

1. Investigar os efeitos da administração de cafeína em dose diária de 10 mg/kg via oral através de gavagem durante 21 dias consecutivos sobre o desempenho de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade em diferentes testes comportamentais para a avaliação das funções motoras, cognitivas e de emocionalidade que incluem: teste do campo aberto, teste do labirinto em cruz elevado, teste de alternância espontânea, teste de reconhecimento social, teste do labirinto aquático, esQUIVA inibitória do tipo *step-down* e teste da suspensão pela cauda;
2. Avaliar os efeitos da administração crônica de cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre os níveis sanguíneos de colesterol total, colesterol HDL e não-HDL e triglicerídeos em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-};
3. Investigar os efeitos da administração crônica de cafeína (10 mg/kg, v.o.) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade através de análise espectrofotométrica;

4. Verificar os efeitos do tratamento crônico com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado de animais das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade através da técnica de imunodeteção de proteínas;
5. Determinação da concentração de dopamina, noradrenalina, serotonina no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Os animais utilizados foram camundongos das linhagens C57BL/6 e camundongos nocautes para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr^{-/-}) provenientes de uma linhagem fundadora adquirida da *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA). Para ambas as linhagens foram utilizadas fêmeas de peso corporal variando entre 20 e 30 gramas. Foram utilizados com idades de 3 e 8 meses de idade no início do protocolo experimental. Os animais foram separados por linhagem e mantidos em grupos de 10 animais por caixa (42 x 34 x 17 cm) e alojados em condições controladas de temperatura (23±1 °C), sob ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas), com livre acesso a água e comida (ração padrão). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados e cuidadosamente conduzidos de acordo com as normas previstas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC, protocolo PP00830/2012).

3.2. Tratamento

Os animais receberam tratamentos crônicos orais via gavagem de soluções de cafeína (Sigma-Aldrich Corporation®) e água de beber (veículo).

Através de um volume relativo de injeção de 1 mL/100 g, os animais do grupo controle receberam água e os animais do grupo teste receberam doses diárias únicas de cafeína na dose de 10 mg/kg diluída na solução veículo. Essa dose foi escolhida por representar em roedores aproximadamente duas xícaras de chá de café diários para um ser humano (FREDHOLM et al., 1999; CHEN et al., 2001).

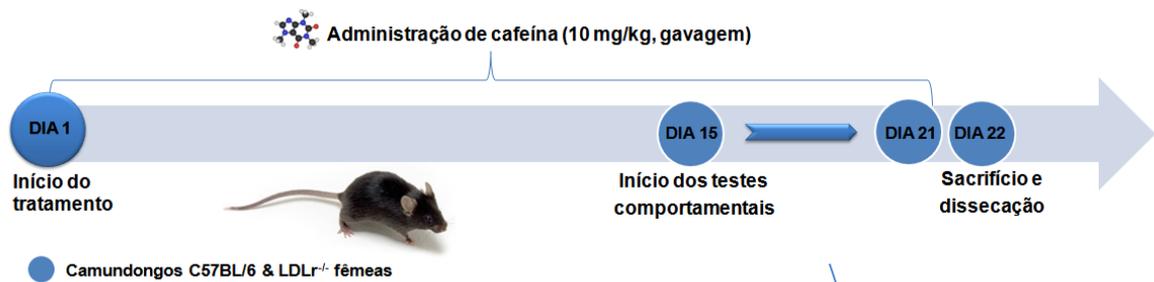
3.3. Desenho experimental

O estudo consistiu na avaliação dos efeitos da administração de cafeína em dose diária de 10 mg/kg via oral através de gavagem durante 21 dias consecutivos, considerando animais de duas idades diferentes (3 ou 8 meses) no início do tratamento. Como ilustrado na Figura 3, os testes comportamentais começaram a partir do 15º dia do tratamento e encerraram no 21º dia do tratamento, no qual os mesmos grupos de animais foram submetidos a uma ou outra sequência de testes, de acordo com a idade. Todos os testes comportamentais foram conduzidos pela parte da manhã e início da tarde (9:00 – 14:00 h), enquanto as administrações de cafeína foram realizadas no final da tarde, buscando evitar possíveis efeitos agudos da cafeína, bem como uma possível síndrome de abstinência.

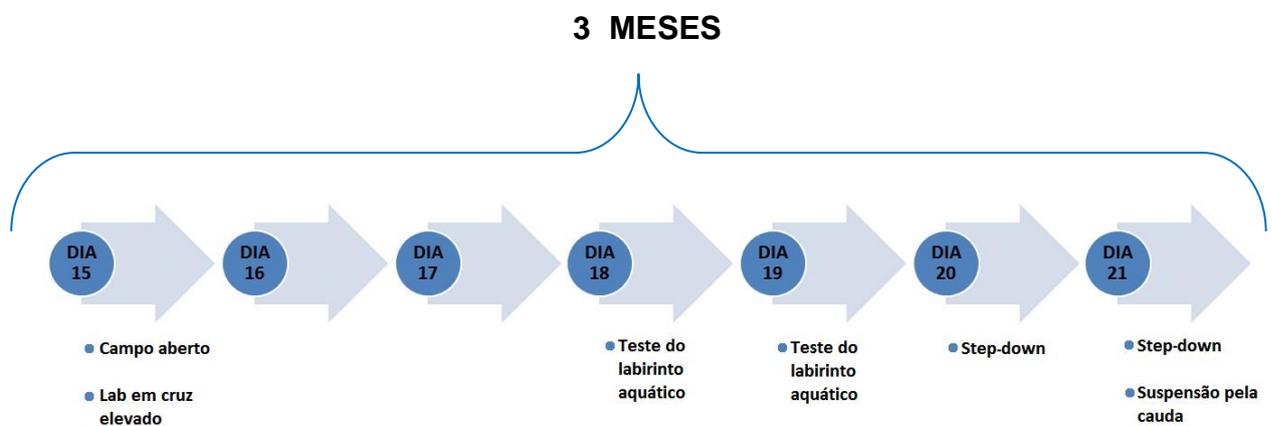
A execução dos testes comportamentais foi realizada na seguinte sequência: labirinto em cruz elevado (dia 15); campo aberto (dia 15); alternância espontânea (dia 16); reconhecimento social (dia 17); labirinto aquático (dias 18 e 19); esQUIVA inibitória do tipo *step-down* (dias 20 e 21); suspensão pela cauda (dia 21) (Figura 3). Para tanto, os animais, separados por linhagem, foram subdivididos em 4 grupos experimentais de acordo com o tratamento: (I) C57BL/6 - controle, (II) C57BL/6 - cafeína, (III) LDLr^{-/-} - controle, (IV) LDLr^{-/-} - cafeína.

No 22º dia do protocolo experimental, após serem privados de alimento durante a noite, foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca dos animais seguida de sacrifício por decapitação e remoção de seus encéfalos para a dissecação das estruturas: hipocampo, estriado e córtex pré-frontal. Posteriormente, estas estruturas encefálicas foram submetidas às análises bioquímicas.

A



B



C

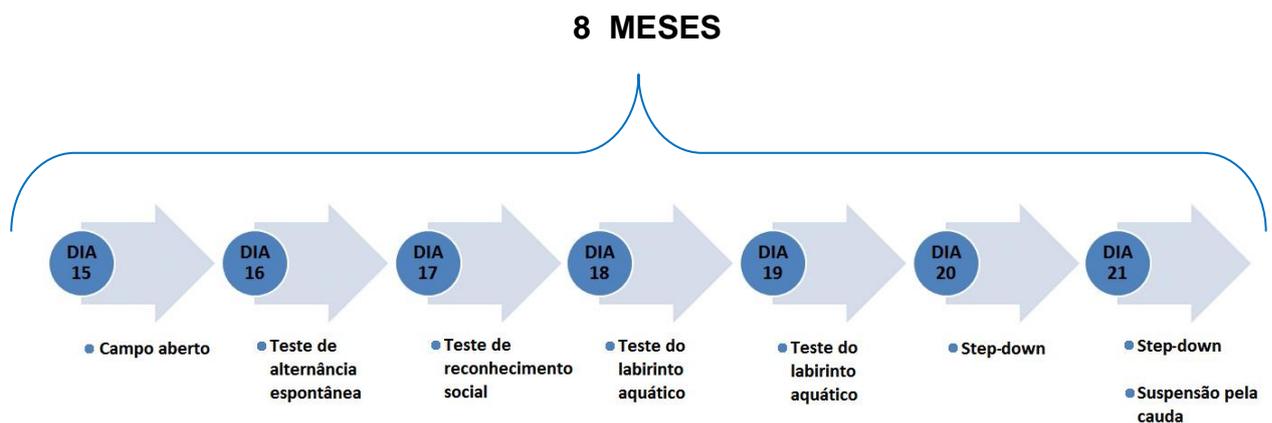


Figura 3. Desenho esquemático do cronograma experimental; com o panorama geral do desenho experimental (A) e os cronogramas dos testes comportamentais dos animais das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 meses (B) e 8 meses de idade (C).

3.4. Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram filmados e os parâmetros comportamentais foram posteriormente analisados através do *software* Any-Maze® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA). Para não comprometer a fidelidade na execução dos testes foram adotadas medidas de controle, tais como: iluminação menos aversiva a uma intensidade aproximada de 20 lx; isolamento acústico para minimizar os ruídos, tanto externos quanto internos; os animais foram ambientados à sala de experimentação durante o período de 1,5 horas antes do início dos testes; limpeza dos aparatos de teste com papel toalha e solução de álcool 10% para evitar a impregnação do odor. Com exceção dos testes de alternância espontânea e esQUIVA inibitória do tipo *step-down*, em todos os demais testes comportamentais, o mesmo experimentador monitorou externamente permanecendo em uma sala anexa à sala do teste enquanto os animais o perfaziam. Outros comportamentos gerais foram avaliados visualmente pelo experimentador durante os períodos de teste. Os testes comportamentais foram os seguintes:

Teste do campo aberto: O aparato consiste em uma arena de material acrílico de chão cinza (50 x 50 cm) cercado por paredes transparentes (50 cm). No teste, cada animal foi colocado no centro da arena e explorou livremente o aparato durante 5 minutos. Como parâmetros de atividade locomotora espontânea foram utilizados a distância total percorrida (m) e velocidade média de locomoção (m/min). Como parâmetros de ansiedade foram utilizados o número de entradas e o tempo de permanência (s) na região central (10 x 10 cm) do campo aberto, considerada mais aversiva para o animal (PRUT & BELZUNG, 2003).

Teste do labirinto em cruz elevado: O teste do labirinto em cruz elevado é amplamente utilizado para investigar efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de drogas em camundongos (LISTER, 1987). O aparato utilizado foi feito de madeira posicionado a uma altura de 40 cm do chão e consiste de um labirinto em forma de cruz, com quatro braços de 5 cm de largura, sendo dois braços sem paredes (braços abertos) de 36 cm de comprimento e dois braços com paredes (braços fechados) de 36 cm de comprimento e 15 cm de altura; e uma região central de 5 cm² na qual os quatro braços se ligam. Cada animal foi colocado na região central de frente para um dos braços fechados podendo explorar livremente toda a extensão dos braços do aparato por 5 minutos. Os parâmetros comportamentais analisados neste teste foram: o número de entradas nos braços abertos, o número de entradas nos braços

fechados, o percentual de entradas nos braços abertos, o total de tempo (s) e o percentual de tempo gasto pelos animais nos braços abertos. A região central de intersecção dos eixos dos braços não foi considerada na análise (AKILLIOGLU et al., 2012).

Teste de alternância espontânea: No teste de alternância espontânea foi utilizado um labirinto em T baseando-se no protocolo descrito por Frye & Walf (2008). O labirinto possui forma de T constituído de três braços de 30 cm de comprimento e 10 cm de largura envoltos por paredes de 20 cm de altura e uma região central na qual os três braços se encontram de 10 cm². O labirinto possui três portas guilhotina, uma para cada braço. Os dois braços alinhados do labirinto são os braços de escolha (direita e esquerda) sendo que o outro braço restante que permite o acesso aos demais é chamado de “braço principal”. No momento do teste, o animal foi solto no início do braço principal, de onde ele entrou no braço da esquerda ou da direita, assim o braço oposto ao escolhido foi bloqueado com a porta guilhotina forçando sua exploração somente ao lado em que se encontrava. Após retornar ao braço principal, fechava-se aí a porta guilhotina contendo o animal e abria-se a porta-guilhotina do braço de escolha que se encontrava fechada, finalizando assim, um ensaio, ou uma alternância. Cada animal foi submetido a 14 ensaios ou o tempo máximo de 900 segundos de teste. Pelo número total de ensaios foi quantificado o número total de alternâncias espontâneas (entrar para explorar o braço esquerdo após ter explorado o braço direito no ensaio anterior e vice-versa). Em seguida, foi calculada a porcentagem total de alternâncias espontâneas de cada grupo de animais. Neste teste, um melhor desempenho é indicado por uma maior porcentagem de alternâncias espontâneas.

Teste de reconhecimento social: Os efeitos do tratamento com cafeína na memória social de curto prazo foram avaliados através do teste de reconhecimento social. O teste já foi devidamente padronizado para camundongos em nosso laboratório (PREDIGER et al., 2010) e baseia-se numa tarefa de reconhecimento social pelo animal, consistindo em duas apresentações sucessivas (5 minutos cada) na qual cada animal foi exposto, separadamente, tanto na primeira como na segunda apresentação, a um mesmo camundongo jovem (aproximadamente 1 mês de idade) e do mesmo sexo, que nunca teve contato com o animal adulto até o momento de início do teste.

Após um período de habituação prévio de 1,5 horas, os animais foram isolados em gaiolas individuais durante 2 horas. Em seguida, foi colocado um animal jovem dentro da

gaiola do animal isolado. As duas apresentações foram separadas por um intervalo de tempo de 30 minutos, no qual o animal jovem permaneceu isolado em uma gaiola individual aguardando para a segunda apresentação (reexposição). O tempo gasto pelo adulto na investigação do jovem (cheirar, farejar, lambar, ou tocar com as patas) durante as duas apresentações foi registrado. Nesse teste, se o período entre as duas apresentações for menor que 40 minutos, o animal adulto geralmente reconhece o animal jovem, indicado por uma redução significativa do tempo de investigação social durante a segunda apresentação. Mas quando a reexposição do animal jovem ocorre depois de um período de tempo mais prolongado (superior a 60 minutos), o animal adulto não reconhece o jovem, ou seja, o tempo de investigação social na segunda apresentação é semelhante ao observado durante a primeira (DANTZER et al., 1987; PREDIGER et al., 2010).

A fim de normalizar as variações entre os diferentes grupos, o tempo de investigação social para cada animal foi expresso como a razão da segunda apresentação em relação à primeira apresentação (Razão de Duração de Investigação - RID). Uma redução no valor da RID reflete uma diminuição no comportamento de investigação durante a segunda apresentação, indicando a capacidade de reconhecimento social do animal (DANTZER et al., 1987; CASTRO et al., 2013).

Teste do labirinto aquático: O teste do labirinto aquático foi utilizado para avaliar a memória espacial de trabalho. O labirinto aquático utilizado foi um tanque circular de 90 cm de diâmetro preenchido com cerca de 60 cm³ de água, a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), onde os animais foram treinados a encontrar uma plataforma de escape (10 x 10 cm) submersa a 1 cm da superfície da água. A navegação foi orientada espacialmente por quatro pistas visuais equidistantes (50 x 50 cm) fixadas nas paredes da sala experimental e fixadas a 30 cm acima da borda do tanque (N, S, L e O).

O protocolo experimental consistiu em duas sessões de treinamento de 8 *trials* com intervalo de 24 horas. Os animais foram soltos individualmente para nadar a partir de quatro pontos de partida que foram distribuídos aleatoriamente em cada dia. A posição da plataforma permaneceu fixa durante a primeira sessão, sendo alterada na segunda sessão para um ponto diferente onde também permaneceu fixa até o fim da sessão. A partir de cada ponto de soltura, os 8 *trials* foram de no máximo 60 s, com 30 s de permanência na plataforma após o animal a ter encontrado, de onde os animais foram imediatamente colocados no próximo ponto de partida. Nas falhas em encontrar a plataforma, os animais foram gentilmente guiados até a

mesma. As latências (em segundos) para encontrar a plataforma nas duas sessões de treinamento no labirinto aquático foram avaliadas como parâmetro de aprendizado.

Esquiva inibitória do tipo *step-down*: Para a avaliação da memória aversiva foi realizado o paradigma da esquiva inibitória do tipo *step-down*. Para tanto, foi utilizado uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm³ com uma plataforma em acrílico com 10 cm² de superfície e 2 cm de altura que foi colocado no centro do assoalho do aparato. Parte do assoalho possui uma grade com barras de bronze com 1 mm de diâmetro, com espaçamento de 1 cm entre elas. O protocolo experimental consistiu de duas sessões. Na primeira sessão cada animal foi posto sobre a plataforma e sua latência para descer sobre a grade (com as quatro patas) foi cronometrada. Na primeira sessão, ao descer da plataforma sobre as grades com as quatro patas o animal recebeu um leve choque nas patas de 0,3 mA durante 2 segundos. Após a sessão de treino, os animais passaram para a segunda sessão (teste), sendo essa, igual à primeira, com exceção de que os animais não receberam choque nas patas. De modo a avaliar a memória de longo prazo, o intervalo entre as sessões de treino e teste foi de 24 horas (MOREIRA et al., 2012 a).

O parâmetro de aprendizado no teste consistiu no animal não descer da plataforma no intervalo de 300 segundos ou fazê-lo após um período de tempo maior do que o observado na primeira sessão.

Teste da suspensão pela cauda: De acordo com Cryan et al. (2005), o teste de suspensão pela cauda é um dos testes comportamentais mais utilizados para a avaliação de compostos com ação antidepressiva em camundongos, sendo um teste pré-clínico de boa validade preditiva. O experimento consistiu em fixar a extremidade distal da cauda do animal a uma barra horizontal de madeira a 60 cm de altura do chão. O animal ficou preso à barra de madeira com uma fita adesiva no ângulo de 90° ao eixo longitudinal da cauda, mantendo-o na vertical, de cabeça para baixo. Condição na qual o comportamento do animal controle é se debater ou manter longas sequências de movimentos corporais continuados procurando apoios ou forçando seu próprio escape. A diminuição significativa de tempo desse comportamento, considerado por tal situação presumivelmente incômoda para o animal, aumentando, assim, a sua imobilidade, está relacionado a comportamentos do tipo depressivo. Dessa forma, cada animal foi suspenso pela cauda durante 6 minutos sendo quantificado o tempo total de imobilidade (em segundos) do animal. A imobilidade foi definida pela ausência de

movimentos iniciados, incluindo balanços passivos do corpo. O animal seria excluído do teste se ele escalasse de modo a se manter agarrado à sua cauda por um período de 3 segundos ou mais (MITCHELL et al., 2013).

3.5. Análises bioquímicas

Após a dissecação do estriado, hipocampo e córtex pré-frontal, estas estruturas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C. Os seus homogenatos foram utilizados para as determinações bioquímicas. Exceto para as análises de imunodeteção de proteínas e HPLC, os homogenatos foram preparados com uma concentração de massa por volume de 1 : 10 em tampão de HEPES de 20 mM e de pH 7.0.

Perfil lipídico: Devido ao fato de estarmos utilizando um modelo animal de hipercolesterolemia familiar, foi analisado o perfil lipídico de ambas as linhagens (C57BL/6 e LDL^{-/-}) nas idades de 3 e 8 meses. Esse perfil consistiu em estimar os níveis plasmáticos de: colesterol total; colesterol HDL; colesterol não-HDL; triglicerídeos. As análises foram feitas a partir do plasma sanguíneo dos animais através de três kits enzimáticos e colorimétricos utilizados de acordo com as instruções do fabricante: Colesterol® - teste enzimático e colorimétrico para a determinação do colesterol no soro e no plasma (Laborclin®/linha Bioliquid); Teste de colesterol HDL – teste colorimétrico (Analisa® / Gold Analisa Diagnostica Ltda.); e por fim, o kit de determinação de triglicerídeos: Triglicerides Liquiform (Labtest®).

Após o último dia de tratamento com cafeína, depois dos animais serem privados de alimento durante a noite, as amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, sendo utilizadas para determinar os níveis de colesterol total e de colesterol não-HDL (no intuito de representar um parâmetro de medição aproximado dos níveis de LDL ou de VLDL). E a concentração de colesterol não-HDL foi obtida através do cálculo: $(LDL + VLDL + IDL) = \text{Colesterol total} - HDL$ (MOREIRA et al., 2012 a).

Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE): A enzima acetilcolinesterase (AChE) catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético. A determinação da atividade da AChE foi baseado no método espectrofotométrico de Ellman et

al. (1961). Para tanto, os homogenatos foram centrifugados a $3000 \times g$, a $4^\circ C$ durante 5 min e uma alíquota foi usada para a determinação da atividade da AChE.

A atividade da AChE foi medida pela produção de tiocolina (composto tiol) a partir da hidrólise da acetilcolina, usando para isso, iodeto de acetiltiocolina como um substrato. Assim, a taxa de hidrólise de iodeto de acetiltiocolina foi medida a 412 nm através da formação de um composto aniônico de cor amarela: o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) que é gerado por uma reação da tiocolina com o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico (DTNB). A leitura de TNB foi feita a partir de espectrofotômetro TECAN®. Os dados foram expressos como nmol de substrato hidrolisado por min por mg de proteína.

Imunodeteccção da enzima tirosina hidroxilase (TH): As proteínas (30 μg /poço) foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese com gel de poliacrilamida) usando um aparato mini-protean tetra (Bio-Rad, São Paulo). Para todos os experimentos foram usados gel de entrada 4% e gel de separação 12%. A eletroforese foi realizada com uma voltagem fixa de 150 V por 90 minutos, ou até o corante ter alcançado o final do gel, utilizando-se um tampão de corrida contendo 190 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1% de SDS.

Após a separação, as proteínas foram transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o aparato Mini Trans-Blot (Bio-Rad, São Paulo). A eletrotransferência foi realizada por 50 min. a 100 V, mantida sob-refrigeração. As membranas foram bloqueadas pela incubação com leite em pó desnatado 5%, dissolvido em TBS-T por 1h e 30min. à temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas com o anticorpo primário mouse anti-TH (Santa Cruz/SC-25269), 1:10000, à $10^\circ C$ overnight, o excesso de anticorpos foi retirado pela lavagem (5 vezes) com TBS-T. Posteriormente, estas membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse IgG (Abcam/ab-6728), 1:10000, e mouse anti-beta-actina peroxidase (Sigma/A3854), 1:50000 conjugado com peroxidase de rábano durante 1 h à temperatura ambiente e então, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T. As membranas foram incubadas durante 3 minutos com a solução de revelação quimioluminescente (2,2 mg luminol, 0,1 M Tris-HCL, 6,8 mM ácido P-cumárico, 0,3% H₂O₂ e pH 8,5), posteriormente, as bandas foram detectadas pela exposição em filme radiográfico. A intensidade das bandas foi calculada por densitometria usando o software livre Image J (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, USA).

Determinação da concentração de monoaminas através de cromatografia líquida de alta

eficiência (HPLC): Os níveis teciduais das monoaminas dopamina (DA) noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) no hipocampo, estriado e córtex pré-frontal dos camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} de 3 e 8 meses foram dosados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-ED) com detecção eletroquímica. Após pesadas, as amostras de tecido foram homogeneizadas por ultrason (Sonics) em 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabisulfito de sódio (Sigma) e 50 ng/ml de padrão interno 3,4-dihidroxibenzilamina hidrobrometo (Sigma). Após centrifugação à 10.000 RPM por 30 minutos a 4 °C, foi injetado 20 µl do sobrenadante em um HPLC (Shimadzu) com uma coluna C-18 de fase reversa (Synergi Fusion-RP C-18; 150 x 4.6 mm i.d., partículas de 4 µm -Phenomenex) com pré-coluna (Security Guard Cartridges Fusion-RP, 4 x 3.0 mm) e detector eletroquímico (ESA Coulochem III) equipado com célula guarda de 350 mV (ESA 5011A) e bomba injetora LC-20AT (Shimadzu). A coluna foi mantida em temperatura controlada (25 °C). A célula contém duas câmaras em série: cada câmara incluindo um eletrodo colorimétrico de grafite, um eletrodo duplo de contagem e um eletrodo duplo de referência. Os potenciais de oxidação foram ajustados para 100 mV para o primeiro eletrodo e a 450 mV para o segundo eletrodo. A fase móvel utilizada foi injetada numa razão de 1 mL/min e apresentou a seguinte composição: 20 g ácido cítrico monoidratado (Merck), 200 mg ácido 1-octano sulfônico (Merck), 40 mg de ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA, Sigma) em 900 mL de água HPLC-grade. O pH do tampão de corrida foi ajustado para 4.0, depois filtrado em filtro de poro com 0.45 µm de diâmetro. Em seguida, foi adicionado metanol (Merck) até atingir-se uma concentração final de 10% (v/v). As concentrações dos neurotransmissores e seus metabólitos foram calculadas pela área sobre curva (corrente vs. tempo) interpolada a uma reta curva padrão obtida de concentrações conhecidas de cada espécie química analisada. A unidade utilizada para expressar essas espécies foi ng/g de peso úmido de tecido.

3.6. Análise estatística

Os valores dos resultados foram expressos como média±erro padrão da média (E. P. M.) ou como mediana com amplitude interquartil ou porcentagem conforme fosse mais adequado ou requerido à expressão específica. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) de 1 ou 2 vias de acordo com o protocolo experimental. Para comparações adicionais decorrentes de valores de probabilidade significantes (p) obtidos a partir da análise de variância, foi utilizado o teste *post-hoc* de Newman-Keuls ou análises subsequentes com o teste t de Student ou o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância considerado para todos os testes foi de $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico STATISTICA® versão 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Testes comportamentais

4.1.1. Efeitos do tratamento com cafeína na atividade locomotora de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade

Após 14 dias de administração oral de cafeína (10 mg/kg, v. o.) em doses únicas diárias, no 15^o dia foi realizado o teste do campo aberto (5 min) para a avaliação da atividade locomotora e parâmetros de ansiedade dos animais.

Os animais LDLr^{-/-} percorreram distâncias maiores do que os animais da linhagem C57BL/6 no teste do campo aberto (Figura 4 A, B). Nos animais com 3 meses de idade (Figura 4 A) a ANOVA de duas vias (linhagem vs. tratamento) revelou um efeito significativo apenas para o fator linhagem [F(1,38)=1,80; p<0,001]. No entanto, em relação aos animais de 8 meses de idade (Figura 4 B), foram observados efeitos significantes para os fatores linhagem e tratamento [F(1,47)=1,80; p<0,0457]. Os animais LDLr^{-/-} de 8 meses de idade tratados com cafeína percorreram distâncias similares aos animais controle da linhagem C57BL/6, evidenciando assim, uma capacidade do tratamento com cafeína em atenuar a hiperlocomção dos animais LDLr^{-/-} de 8 meses de idade (Figura 4 B).

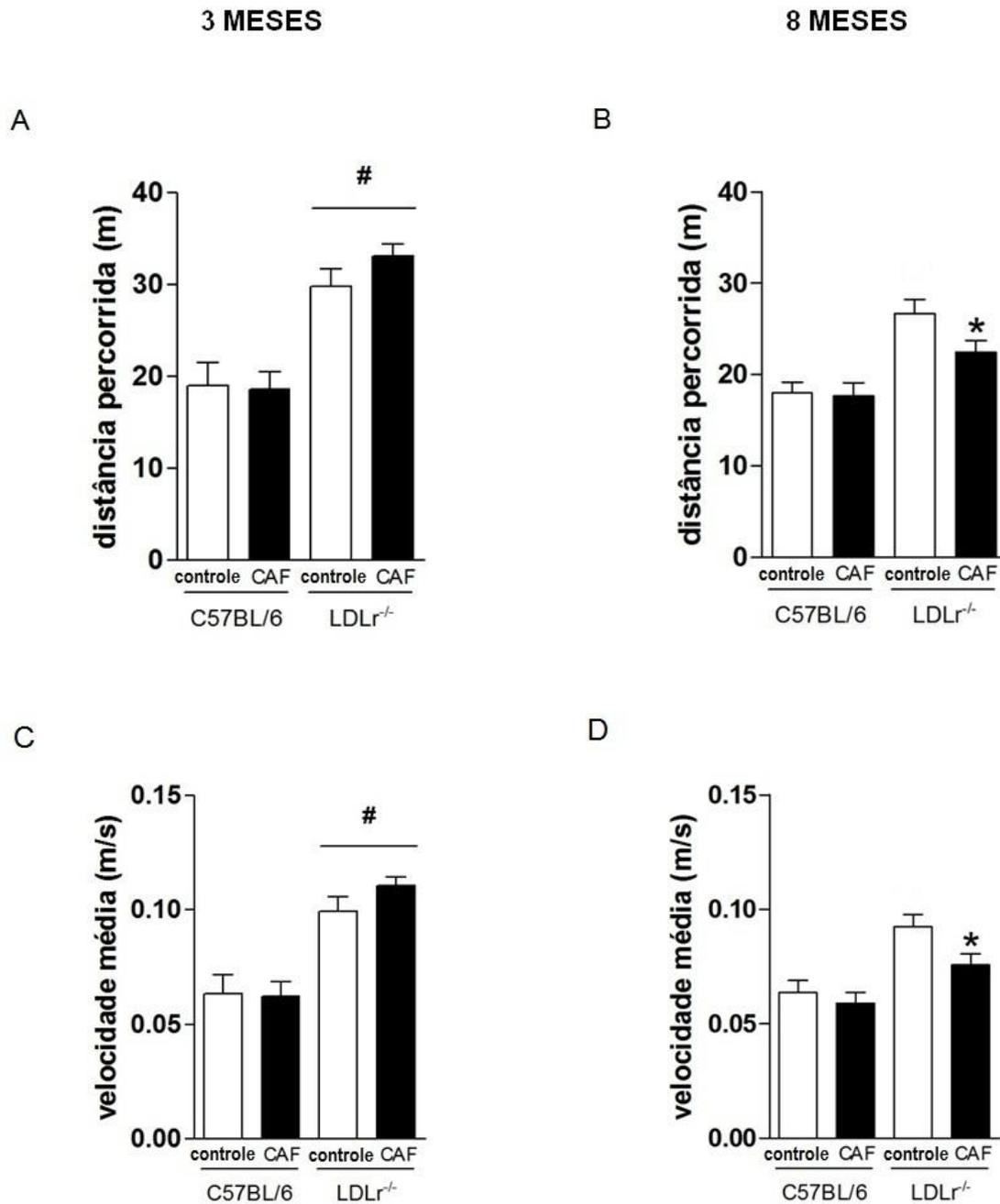


Figura 4. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) na distância percorrida (m) e velocidade média (m/s) durante 5 min do teste do campo aberto nos animais das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 meses (gráficos A e C) e 8 meses de idade (gráficos B e D). As barras representam a média ± E. P. M. de 10-15 animais por grupo (CAF: cafeína). #p ≤ 0,05 comparado à linhagem C57BL/6. *p ≤ 0,05 comparado ao grupo controle da mesma linhagem.

No parâmetro de velocidade média percorrida no teste do campo aberto (Figura 4 C, D), semelhante aos resultados de distância percorrida, os grupos de animais da linhagem LDLr^{-/-} apresentaram velocidades médias maiores do que aquelas dos camundongos C57BL/6. Na linhagem C57BL/6, os grupos tratados com cafeína de ambas as idades não diferiram de seus respectivos controles. Nos animais de 3 meses de idade (Figura 4 C), a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo apenas para o fator linhagem [F(1,38)=1,37; p<0,001]. A análise não revelou efeito significativo para o tratamento ou interação entre linhagem e tratamento em nenhum dos dois parâmetros.

Em relação aos animais LDLr^{-/-} de 8 meses de idade (Figura 4 D), a ANOVA revelou um efeito significativo para o fator tratamento [F(1,47)=1,36; p<0.028], reforçando o achado de que a cafeína é capaz de atenuar a hiperlocomoção de animais LDLr^{-/-} com 8 meses de idade.

4.1.2. Efeitos do tratamento com cafeína sobre parâmetros de ansiedade em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade

Quanto ao número de entradas na área central do campo aberto (Figura 5 A), a ANOVA revelou um efeito significativo para o fator linhagem para os animais de 3 meses de idade [F(1,38)=1,80; p<0,05], onde os animais LDLr^{-/-} entraram mais vezes na área central, independente do tratamento.

O número de entradas na área central do campo aberto para os animais de 8 meses (Figura 5 B) foi em média menor do que aquela dos animais com 3 meses. A ANOVA indicou um efeito significativo para o fator linhagem [F(1,46)=1,10; p<0,0496], sendo observado um maior número de entradas dos animais da linhagem LDLr^{-/-} tratados com veículo quando comparado ao grupo controle da linhagem C57BL/6.

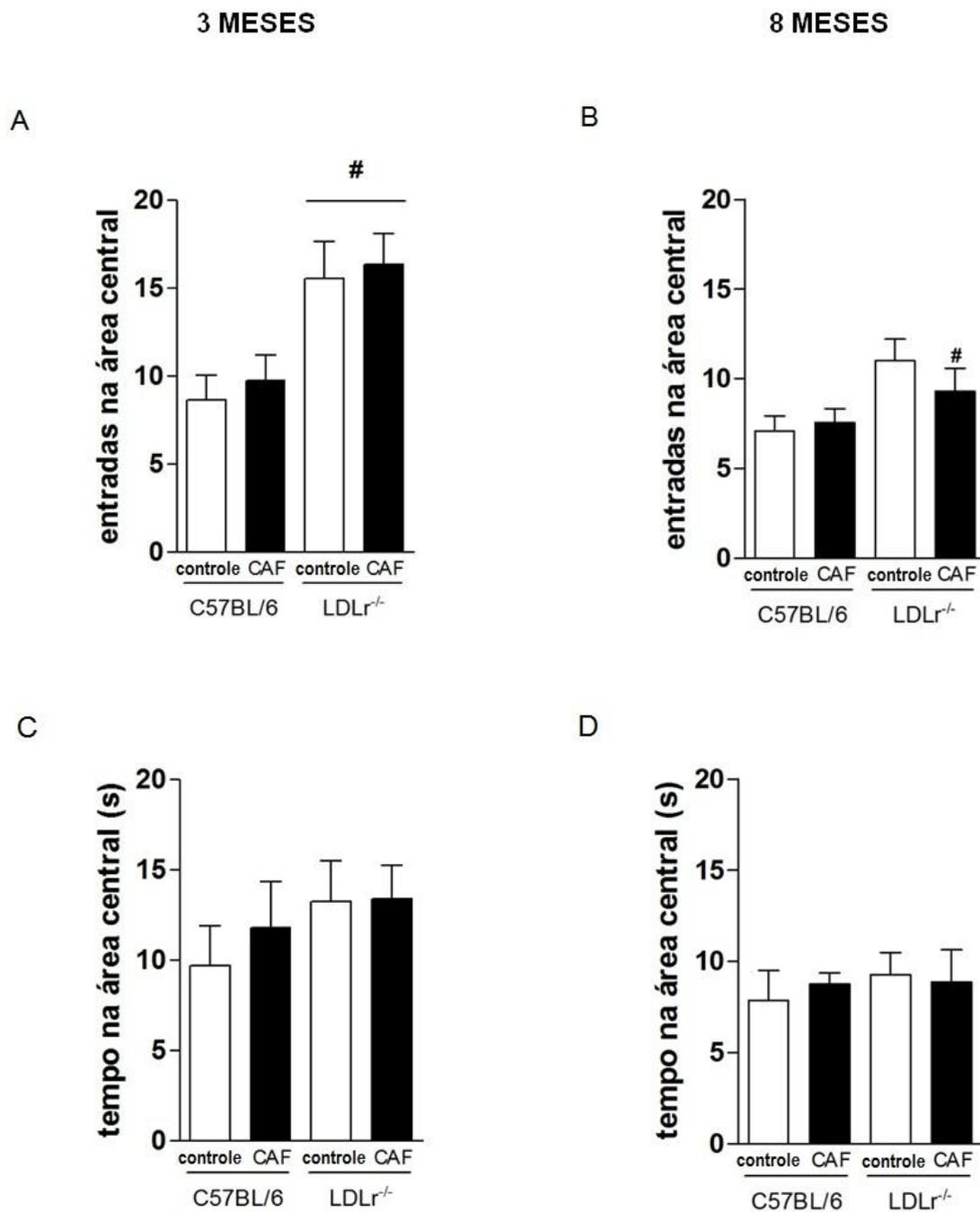


Figura 5. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) no número de entradas e tempo de permanência (s) na área central do campo aberto durante 5 min em animais das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 meses (gráficos A e C) e 8 meses (gráficos B e D) de idade. As barras representam a média ± E. P. M. de 10-15 animais por grupo (CAF: cafeína). #p ≤ 0,05 comparado à linhagem C57BL/6.

Quanto ao tempo de permanência na área central, a ANOVA de 2 vias não revelou nenhum efeito significativo do fator tratamento para as linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} de ambas as idades. Como a área central do campo aberto em geral é considerada mais aversiva

pelo animal, os resultados obtidos indicam que o tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) não apresentou efeitos significativos relacionados à presença de ansiedade.

Buscando confirmar estes resultados, após 14 dias de tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.), os animais de 3 meses de idade foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado para investigar possíveis comportamentos relacionados à ansiedade.

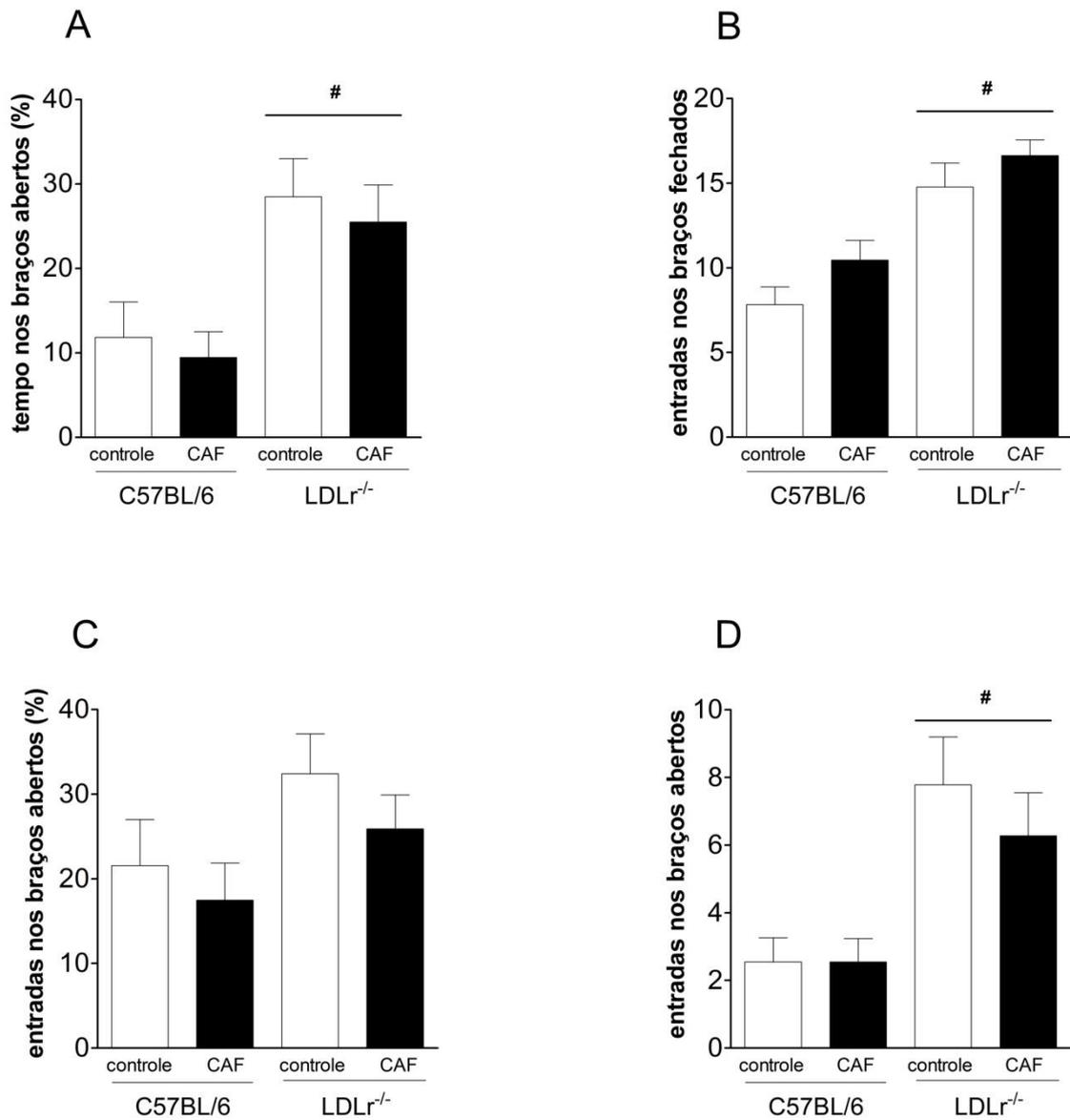


Figura 6. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre parâmetros de ansiedade em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 meses de idade avaliados no labirinto em cruz elevado. As barras representam a média ± E. P. M. de 9-12 animais por grupo (CAF: cafeína). #p < 0,05 quando comparado à linhagem C57BL/6.

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator linhagem (Figura 6), no qual C57BL/6 e LDLr^{-/-} diferiram entre si, mas não em relação aos seus respectivos grupos controle. Foram observadas diferenças significativas nos seguintes parâmetros: porcentagem de tempo nos braços abertos [F(1,38)=10,48; p<0,05] (Figura 6 A); número de entradas nos braços fechados [F(1,38)=33,36; p<0,05] (Figura 6 B); e números de entradas nos braços abertos [F(1,38)=18,34; p<0,05] (Figura 6 D).

Os resultados indicam que as diferenças significativas observadas são dependentes das características de cada linhagem e que o tratamento crônico com cafeína na presente dose não influenciou os comportamentos relacionados à ansiedade. Além disso, os resultados do número de entradas nos braços fechados somam em confirmar a presença da hiperlocomoção nos animais LDLr^{-/-} e, a exemplo do que foi observado no teste do campo aberto, quanto a este parâmetro a cafeína não modificou a atividade locomotora dos animais LDLr^{-/-} de 3 meses de idade.

4.1.3. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a memória de curta duração de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 8 meses de idade

Após 15 e 16 dias de tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.), a memória de curto prazo de animais de ambas as linhagens com 8 meses de idade foi avaliada nos testes de alternância espontânea e reconhecimento social.

No labirinto em T, todos os grupos apresentaram significativamente uma porcentagem superior a 50% de alternâncias espontâneas entre os braços, evidenciando assim, a presença da memória de curto prazo neste teste. Os animais atingiram em média 61,37% de alternâncias espontâneas, considerando todos os grupos, e a ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas entre os grupos [$F(1,16)=,17073$; $p>0,68$] (Figura 7).

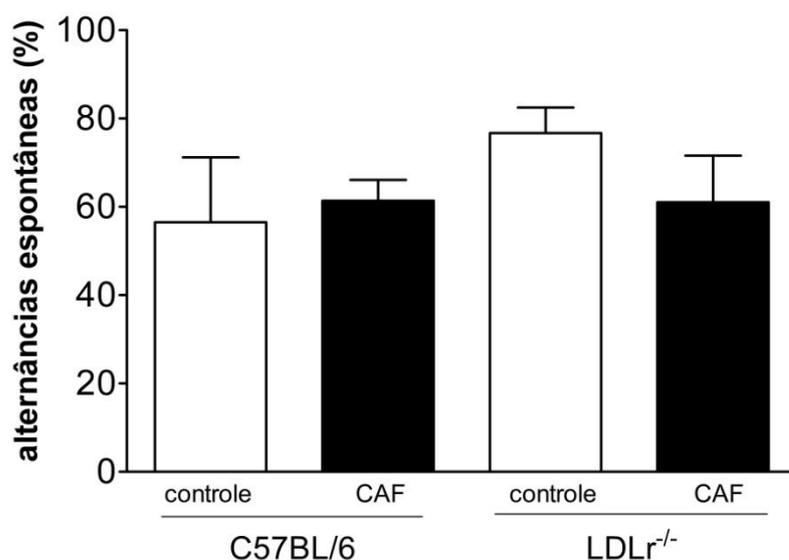


Figura 7. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a memória espacial de curto prazo de animais das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 8 meses de idade avaliada no teste de alternância espontânea . As barras representam a média \pm E. P. M. de 5-6 animais por grupo (CAF: cafeína).

No teste de reconhecimento social, a ANOVA revelou diferença significativa apenas para o fator linhagem [$F(1, 17)=26,00$; $p<0,05$] para animais de 8 meses (Figura 8), onde os camundongos $LDLr^{-/-}$ (independente do tratamento) apresentaram um índice RID (Razão de Duração de Investigação) significativamente maior do que os animais C57BL/6. Este aumento no RID indica que o tempo de investigação social na segunda apresentação foi semelhante ao tempo da primeira apresentação, demonstrando assim, um prejuízo de reconhecimento social dos animais nocautes de 8 meses, independente do tratamento.

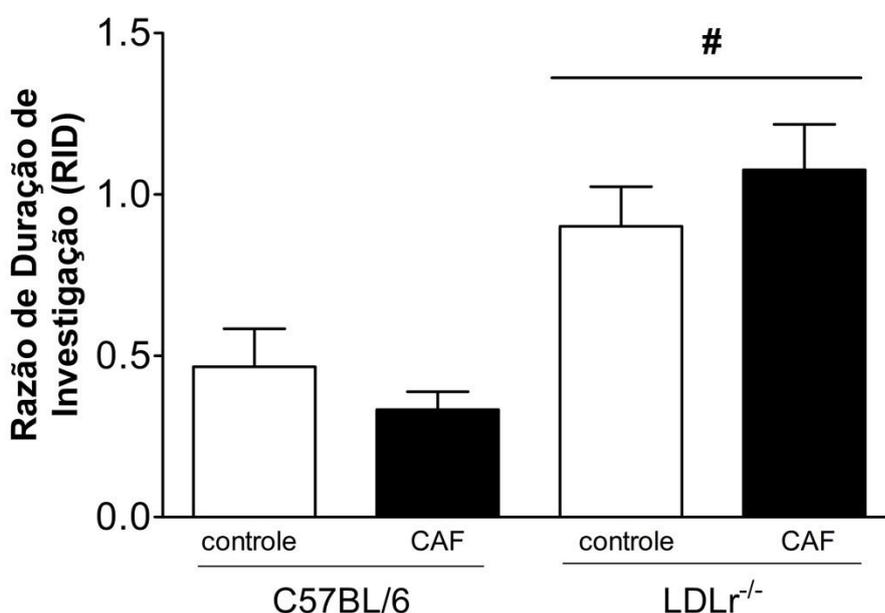


Figura 8. Efeitos do tratamento com caféina (10 mg/kg, v. o.) sobre a memória social de camundongos das linhagens C57BL/6 e $LDLr^{-/-}$ com 8 meses de idade. As barras representam a média \pm E. P. M. da razão do tempo de investigação (RID) de 5-6 animais por grupo (CAF: caféina). # $p \leq 0,05$ comparado à linhagem C57BL/6.

4.1.4. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a memória espacial em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade

Após 17 dias de tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.), foi realizado o treinamento no labirinto aquático em duas sessões (8 *trials* por sessão) com intervalo de 24 horas (dia 1 e dia 2).

Para os animais de 3 meses, a latência média de escape em encontrar a plataforma submersa (Figura 9 A, B), incluindo todos os pontos de soltura dos grupos, não foram significativamente diferentes para cada dia de teste isolado. Porém, comparando a latência do primeiro dia, para cada um dos grupos, com a sua respectiva latência no segundo dia do teste, a ANOVA de duas vias revelou ($p < 0,05$) que todos os grupos, independente do tratamento, obtiveram latências menores no segundo dia: C57BL/6 - controle [F(1,35)=2,30; $p < 0,001$]; C57BL/6 - cafeína [F(1,35)=2,30; $p < 0,05$]; LDLr^{-/-} - controle [F(1,36)=2,51; $p < 0,001$]; LDLr^{-/-} - cafeína [F(1,36)=2,51; $p < 0,05$]. Estes resultados indicam que o desempenho dos animais foi melhor no segundo dia, gastando menos tempo para encontrara plataforma.

A latência média de escape, incluindo todos os pontos de soltura, para os animais de 8 meses de idade (Figura 9 C, D) não se mostraram significativamente diferentes para cada dia de teste isolado, com a exceção do grupo C57BL/6 – cafeína no segundo dia (Figura 9 D), no qual a ANOVA de duas vias revelou ser diferente do grupo LDLr^{-/-} - cafeína no mesmo dia [F(1,16)=2,39; $p < 0,05$]. Além disso, a comparação para cada um dos grupos, da latência do primeiro dia com a sua respectiva latência no segundo dia de teste, nesses animais de 8 meses não houve redução significativa da latência no segundo dia, exceto pelo grupo C57BL/6 – cafeína [F(1,26)=1,95; $p < 0,05$] (Figura 9 D).

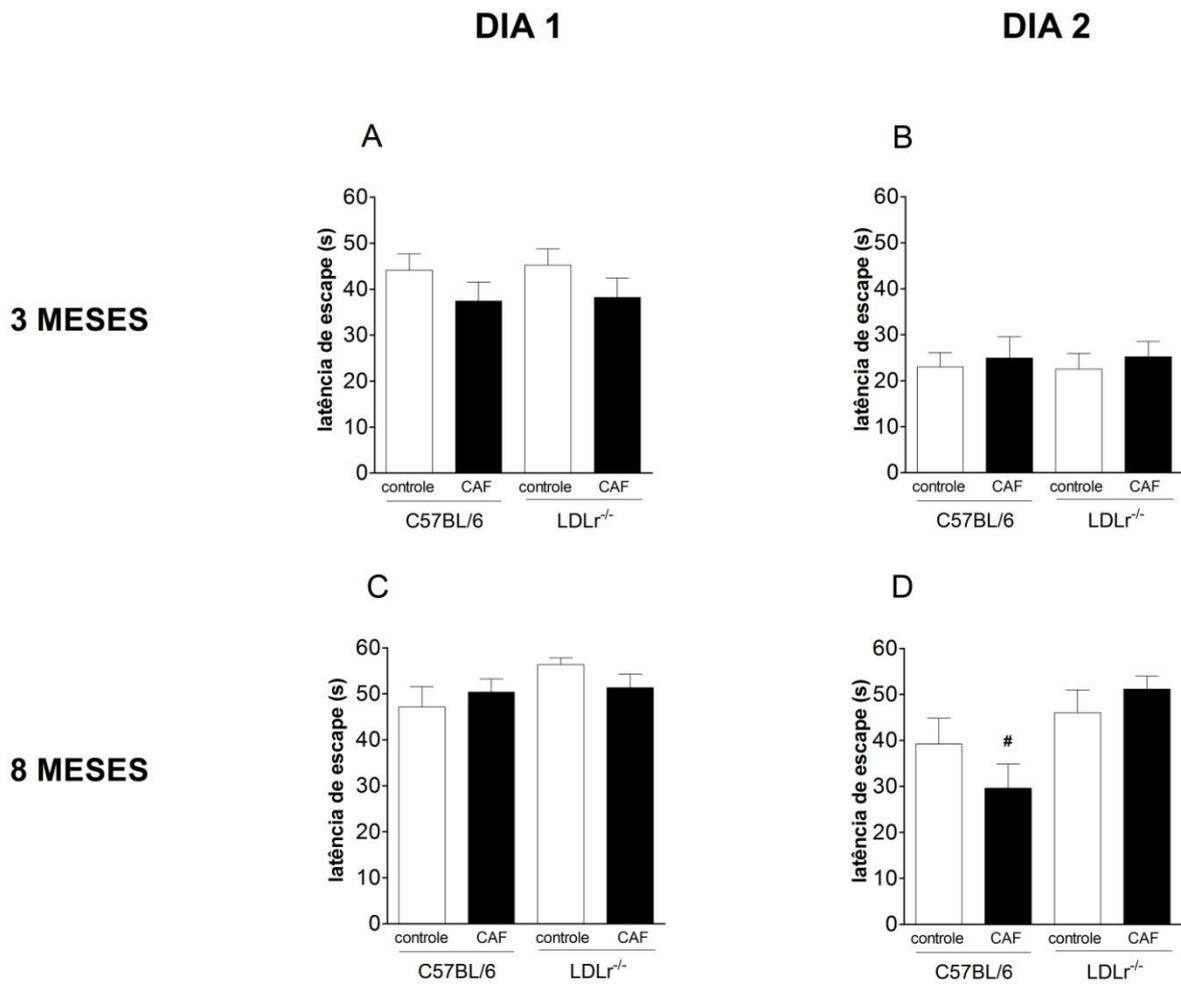


Figura 9. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a latência média de escape no dia 1 e no dia 2 no labirinto aquático de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 meses (gráficos A e B) e 8 meses (gráficos C e D) de idade. As barras representam a média ± E. P. M. de 9-10 animais por grupo (CAF: cafeína). #p ≤ 0,05 comparado ao grupo LDLr^{-/-} - cafeína no mesmo dia e comparado a si mesmo em relação ao DIA 1.

Abaixo, nas Figuras 10 e 11 estão apresentados os resultados dos animais com 3 meses e 8 meses de idade, respectivamente, quanto ao desempenho em encontrar a plataforma nos treinamentos dos dias 1 e 2.

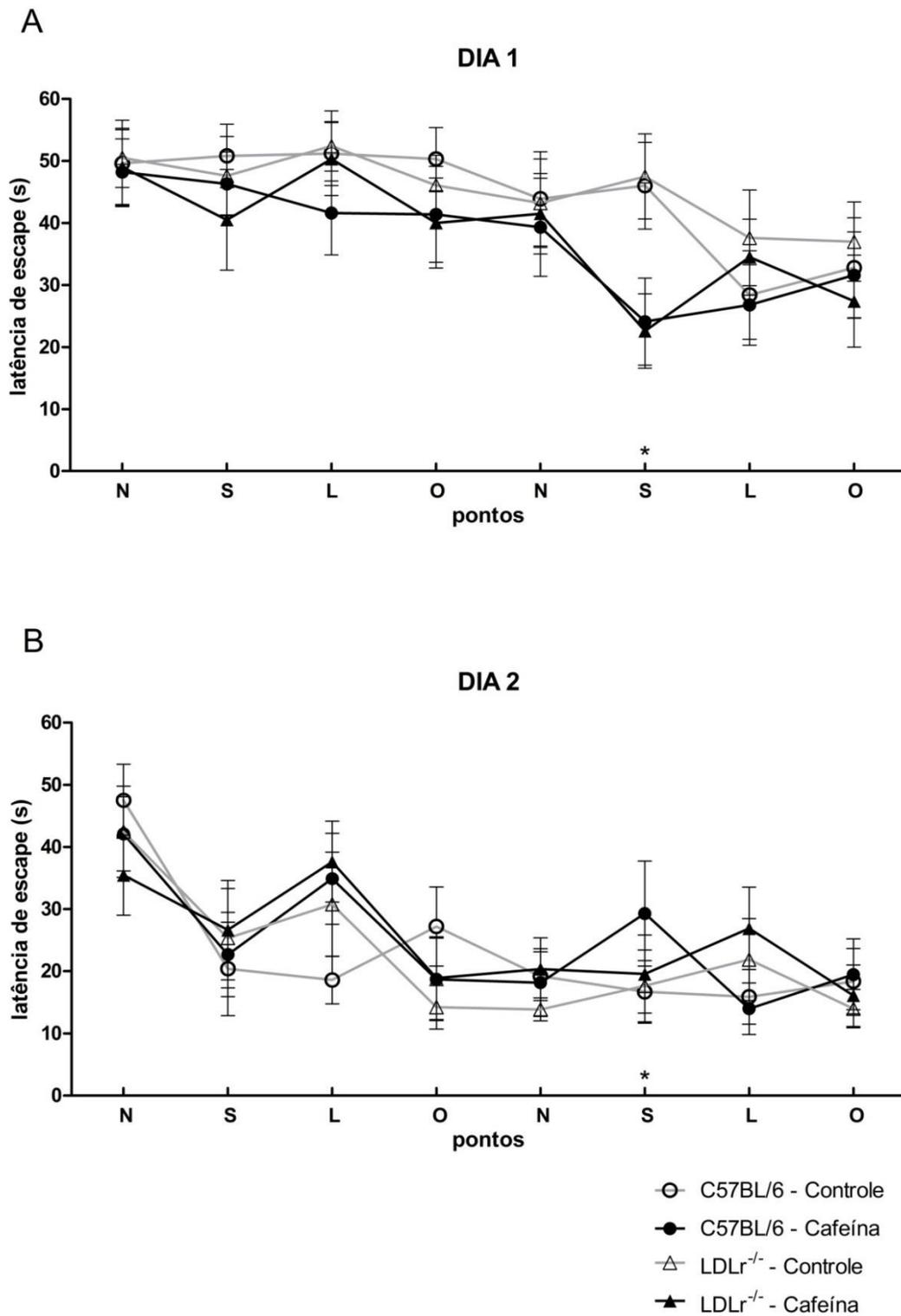


Figura 10. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) no desempenho de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 meses de idade no labirinto aquático. Os resultados são expressos pela média ± E. P. M. da latência para encontrar a plataforma de 10 animais por grupo. *p ≤ 0,05 comparado ao grupo controle da mesma linhagem.

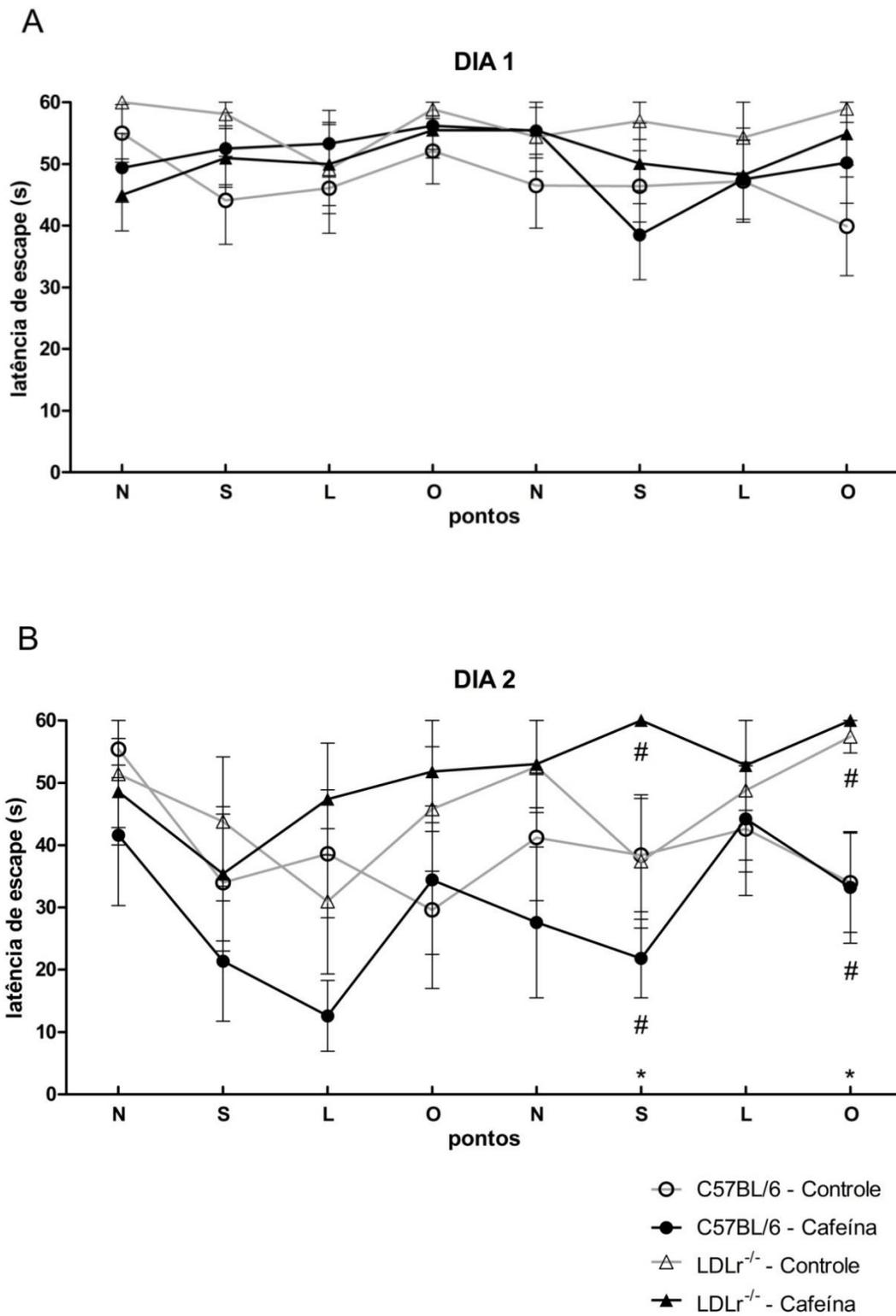


Figura 11. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) no desempenho de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 8 meses de idade no labirinto aquático. Os resultados são expressos pela média ± E. P. M. da latência para encontrar a plataforma de 10 animais por grupo. *p ≤ 0,05 comparado ao grupo controle da mesma linhagem. #p ≤ 0,05 comparado ao grupo cafeína da outra linhagem.

4.1.5. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a memória aversiva em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade

No dia 20 e 21 de tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) foi realizado o teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down* para a avaliação da memória aversiva de longo prazo 24 h após a sessão de treino.

Os resultados estão representados em mediana e intervalo interquartil. Como os resultados representam amostras dependentes e não seguiram distribuição gaussiana, foi aplicado o teste estatístico de Kruskal-Wallis. A análise estatística revelou que para os animais de 3 meses (Figura 12 A), independente do tratamento, apenas os animais C57BL/6 apresentaram latências maiores que 24 h após o treino ($p < 0,05$), ou seja, exibiram o comportamento relacionado à presença de memória aversiva. No entanto, para os animais de 8 meses (Figura 12 B), não foram reveladas diferenças significativas entre os grupos, demonstrando déficits deste tipo de memória.

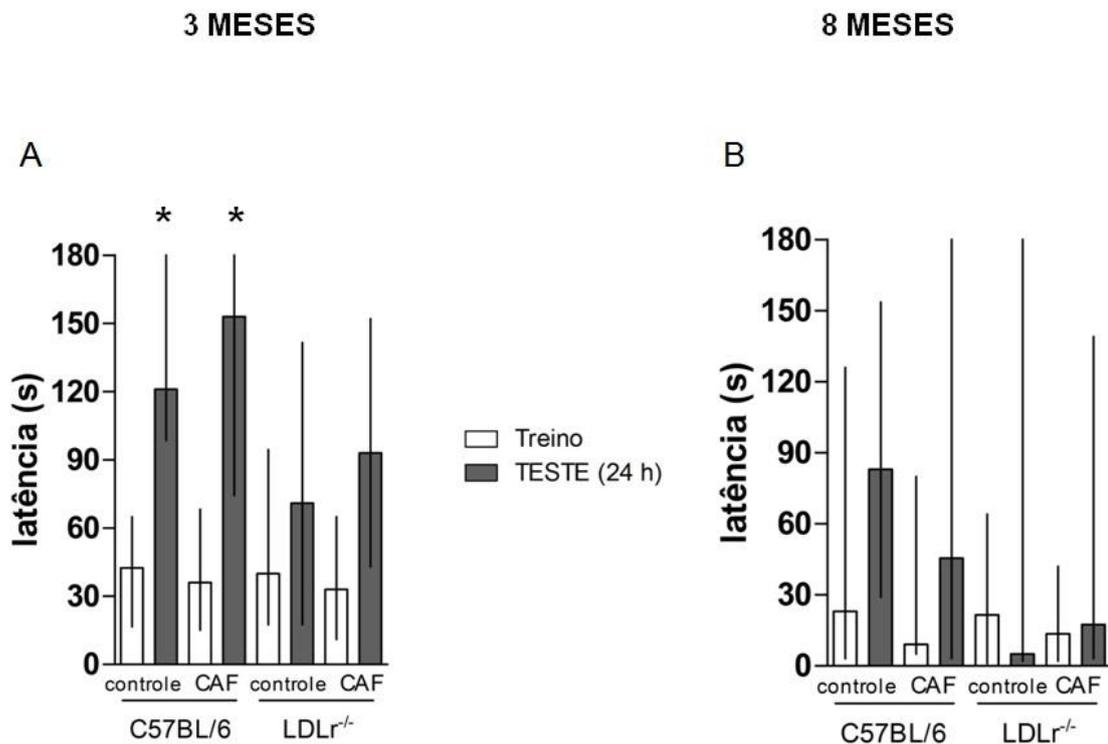


Figura 12. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a memória aversiva de longo prazo de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade avaliados na esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. As barras representam a mediana com amplitude interquartil de 9-16 animais por grupo (CAF: cafeína). * $p \leq 0,05$ comparado à sessão de treino do mesmo grupo.

4.1.6. Efeitos do tratamento com cafeína sobre comportamentos do tipo depressivo em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade

Após 20 dias da administração de cafeína (10 mg/kg, v. o.), os animais foram submetidos ao teste da suspensão pela cauda para avaliar comportamentos relacionados à depressão.

Quanto aos animais de 3 meses (Figura 13 A), a ANOVA não revelou diferenças significativas entre os grupos no tempo de imobilidade. No entanto, para os animais de 8 meses (Figura 13B), houve diferenças significativas no fator linhagem em que a ANOVA revelou que os animais LDLr^{-/-} - controle e LDLr^{-/-} - cafeína ficaram imóveis por tempos significativamente maiores em comparação com o grupo C57BL/6 - controle [F(1,17)=,00658; p<0,05]. {LDLr^{-/-} - controle vs. C57BL/6 - cafeína [F(1,17)=,00658; p<0,0576]; LDLr^{-/-} - cafeína vs. C57BL/6 - cafeína [F(1,17)=,00658; p<0,0622]}.

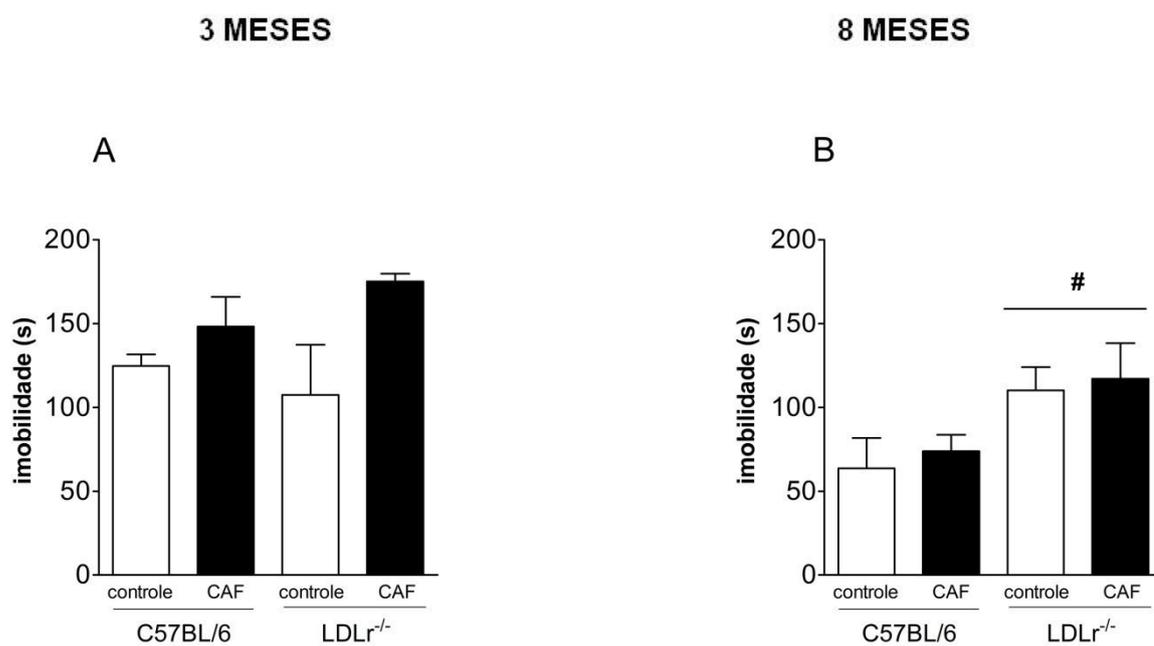


Figura 13. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre comportamentos do tipo depressivo de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 (gráfico A) e 8 meses (gráfico B) de idade avaliados no teste da suspensão pela cauda. As barras representam a média ± E. P. M. de 4-6 animais por grupo. #p≤ 0,05 comparado à linhagem C57BL/6 - controle.

4.2. Análises bioquímicas

4.2.1. Efeitos do tratamento com cafeína sobre o perfil lipídico em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade

O perfil lipídico dos animais de 3 e 8 meses de idade com os níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL (considerado como medida de LDL) e triglicerídeos são apresentados na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre os níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL e triglicerídeos dos camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade.

GRUPOS	Colesterol total (mg/dL)	Colesterol HDL (mg/dL)	Colesterol não-HDL (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
<u>3 meses</u>				
C57BL/6 - controle	100,47±05,78	50,92±1,63	049,55±04,49	176,39±19,82
C57BL/6 - CAF	093,38±05,46	47,36±1,72	046,01±03,88	169,37±20,54
LDLr ^{-/-} - controle	182,82±17,08 #	52,22±3,24	123,80±12,62 #	198,55±31,51 &
LDLr ^{-/-} - CAF	163,13±10,85 #	49,72±2,29	113,41±08,90 #	202,83±32,77 #
<u>8 meses</u>				
C57BL/6 - controle	092,09±05,29	37,24±1,31	047,73±05,09	108,55±01,78
C57BL/6 - CAF	087,25±05,23	39,05±2,73	044,88±05,55	110,66±02,20
LDLr ^{-/-} - controle	163,84±04,21 #	40,32±3,61	115,04±05,06 #	133,15±03,26 #
LDLr ^{-/-} - CAF	166,46±05,00 #	38,59±3,20	122,93±05,29 #	125,28±02,22 #

Obs.: Grupos de 9-11 animais (CAF: cafeína). #p≤ 0,05 comparado aos grupos da linhagem C57BL/6.
&p≤ 0,05 comparado apenas ao grupo controle da linhagem C57BL/6.

Os níveis plasmáticos de HDL foram os únicos que não apresentaram diferenças entre linhagens para os animais de 3 e 8 meses de idade. Quanto aos demais parâmetros, foram observados aumentos nos níveis lipídicos nos animais da linhagem LDLr^{-/-} em ambas as idades. A ANOVA revelou níveis de colesterol não-HDL superiores nos animais LDLr^{-/-} de 3 meses de idade (Tabela 1) em relação à linhagem C57BL/6 [F(1,38)=,01126; p<0,05], assim como, níveis de colesterol não-HDL superiores nos animais LDLr^{-/-} de 8 meses de idade em relação à linhagem C57BL/6 [F(1,39)=,01041; p<0,05]. A ausência de diferenças entre os grupos tratados com cafeína e seus respectivos controles, deixa claro que o tratamento com a cafeína não alterou o perfil lipídico em ambas as linhagens, tanto para os animais de 3 como para os de 8 meses de idade.

4.2.2. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade

A mensuração da atividade da enzima acetilcolinesterase revelou que, em geral, foi menor nos animais com 8 meses em comparação aos animais com 3 meses de idade (Figura 16). No córtex pré-frontal dos camundongos com 3 meses de idade (Figura 16 A), a ANOVA revelou efeitos significativos do grupo LDLr^{-/-} - cafeína em relação a ambos os grupos da linhagem C57BL/6 [F(1,15)=7,9103; p<0,05], no qual os animais LDLr^{-/-} tratados com cafeína apresentaram uma redução na atividade da acetilcolinesterase, porém não estatisticamente diferente do grupo LDLr^{-/-} - controle [F(1,15)=7,9103; p<0,0707]. No hipocampo dos animais com 3 meses (Figura 16 B), o grupo C57BL/6 - cafeína foi observado um aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase em comparação ao grupo controle da mesma linhagem [F(1,15)=8,1079; p<0,05].

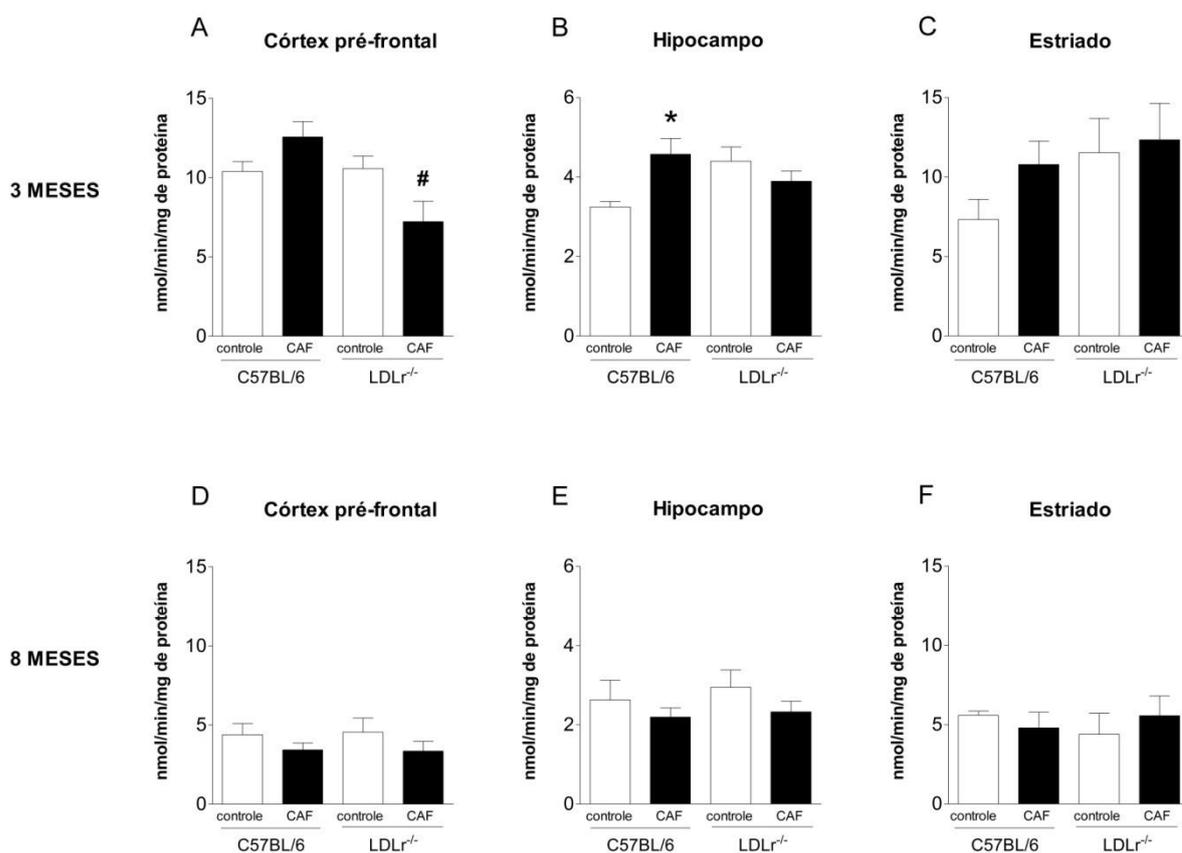


Figura 14. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex pré-frontal (A e D), hipocampo (B e E) e estriado (C e F) de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 8 meses de idade. As barras representam a média ± E. P. M. de 5 animais por grupo (CAF: cafeína). #p≤ 0,05 comparado à linhagem C57BL/6. *p≤ 0,05 comparado ao grupo controle da mesma linhagem.

4.2.3. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade

Na figura 17 são mostrados os resultados dos efeitos da administração crônica de cafeína sobre a expressão da enzima TH no estriado de animais com 3 e 8 meses de ambas as linhagens, investigadas através de imunodeteção de proteínas. Em média, os animais de 8 meses apresentaram valores maiores de densidade óptica relativa, no entanto, a ANOVA não revelou diferenças significativas em ambas as idades {3 meses, linhagem vs. tratamento [F(1,25)=,54762; p>0,47]; 8 meses, linhagem vs. tratamento [F(1,14)=,80372; p>0,50]}.

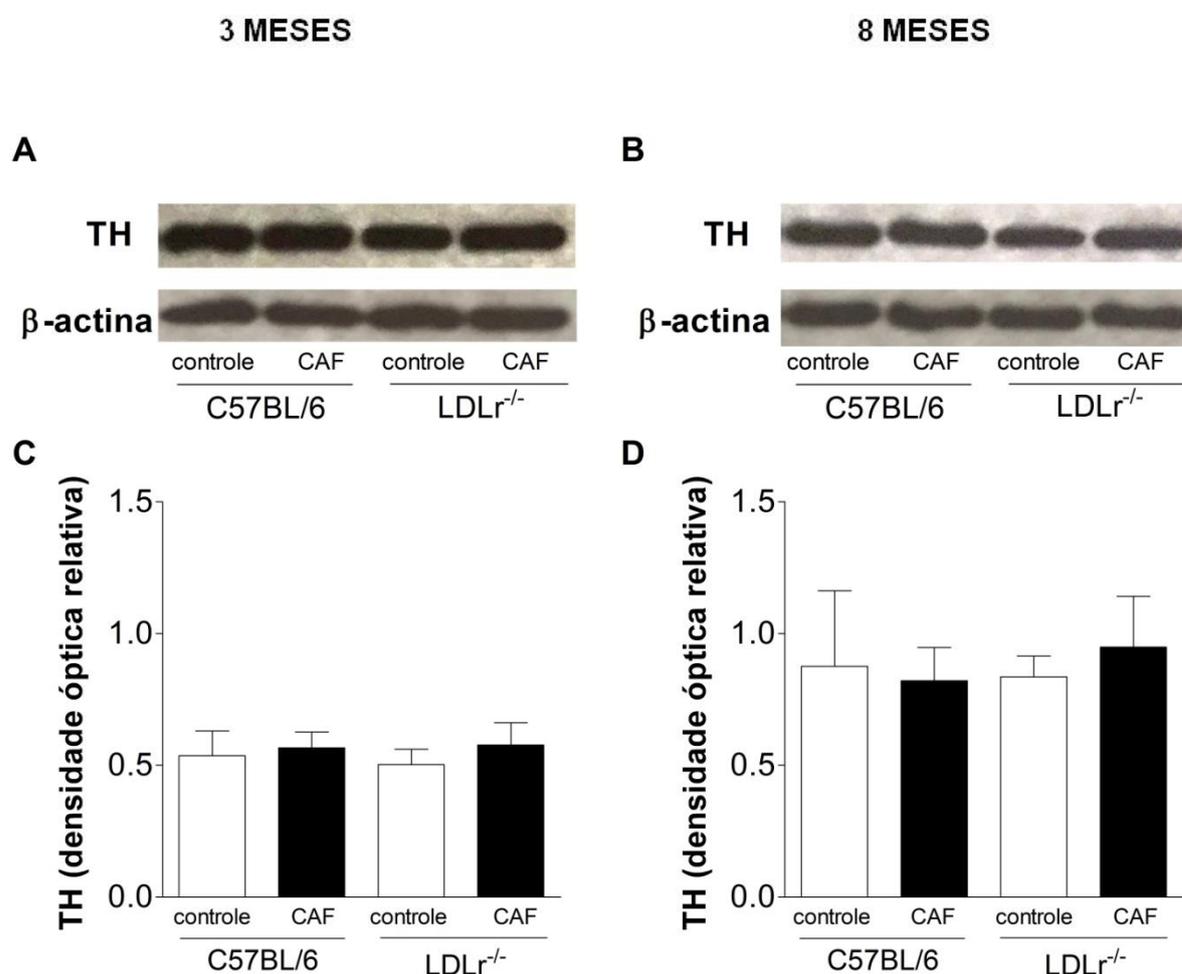


Figura 15. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 meses (A e C) e 8 meses (B e D) de idade. As barras representam a média \pm E. P. M. de 4-8 animais por grupo (CAF: cafeína).

4.2.4. Efeitos do tratamento com cafeína sobre a concentração de monoaminas e seus metabólitos no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} com 3 e 8 meses de idade

Abaixo, os resultados de HPLC das estruturas encefálicas: hipocampo, estriado e córtex pré-frontal dos animais com 3 e 8 meses de idade com a quantificação do conteúdo dos neurotransmissores dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT).

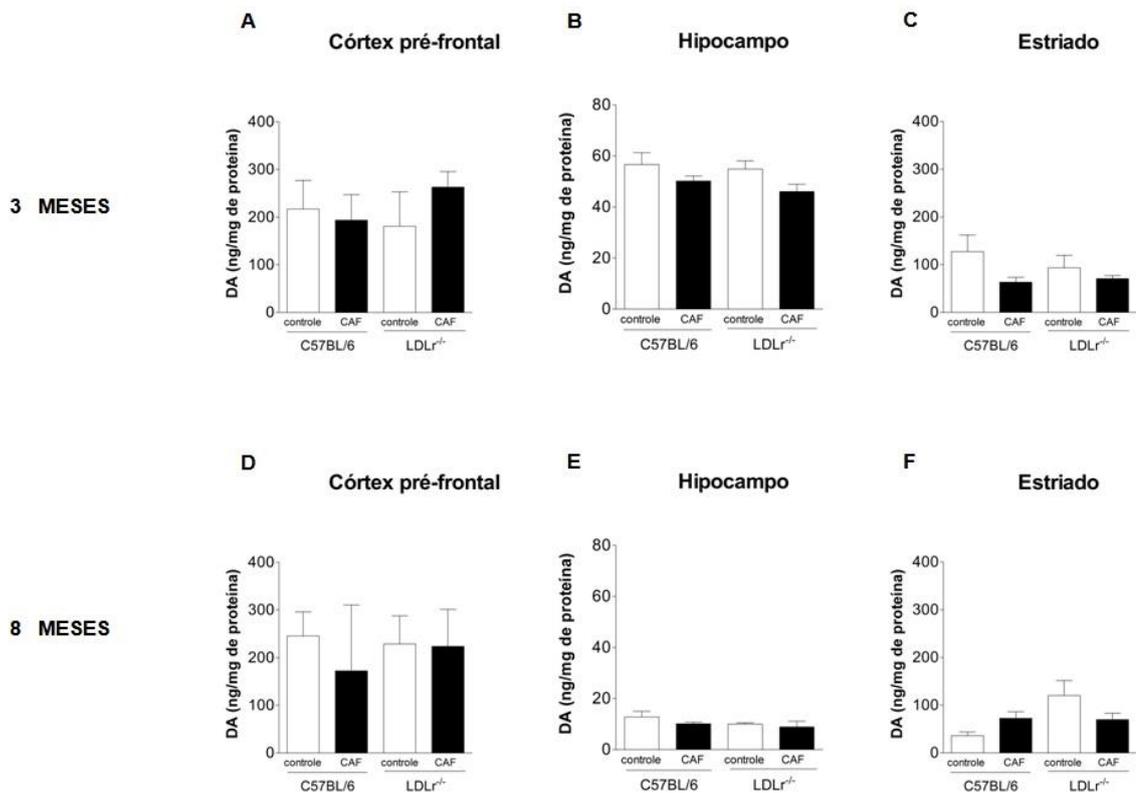


Figura 16. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a concentração de dopamina (DA) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos de 3 meses (A-C) e 8 meses de idade (D-F) das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-}. As barras representam a média \pm E. P. M. de 8 animais (3 meses de idade) e de 3 animais (8 meses de idade) por grupo (CAF: cafeína).

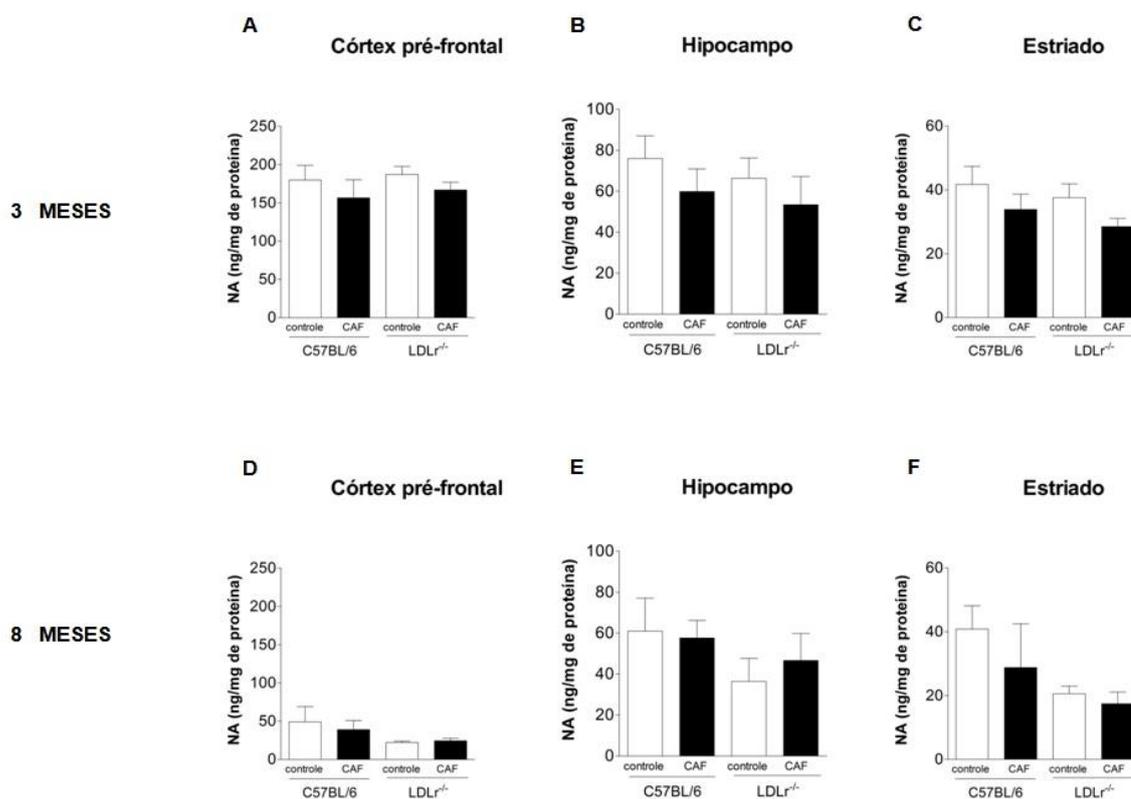


Figura 17. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a concentração de noradrenalina (NA) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos de 3 meses (A-C) e 8 meses de idade (D-F) das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-}. As barras representam a média \pm E. P. M. de 8 animais (3 meses de idade) e de 3 animais (8 meses de idade) por grupo (CAF: cafeína).

A ANOVA revelou diferenças significativas somente nos níveis de 5-HT (Figura 20). Houve diferenças dependentes de linhagem nos animais com 3 meses: LDLr^{-/-} apresentou diminuições nos níveis de 5-HT no córtex pré-frontal [F(1,25)=14,008; p<0,001] e no estriado [F(1,22)=16,706; p<0,001] em relação à linhagem C57BL/6; quanto ao hipocampo, foi observada uma diferença apenas entre os grupos controles de cada linhagem [F(1,25)=,13542; p<0,001] (Figura 20, B). Em relação aos animais com 8 meses de idade, o grupo C57BL/6 - cafeína apresentou uma diminuição nos níveis de 5-HT no hipocampo em relação ao seu respectivo grupo controle [F(1,8)=0,0000; p<0,001] (Figura 20, E).

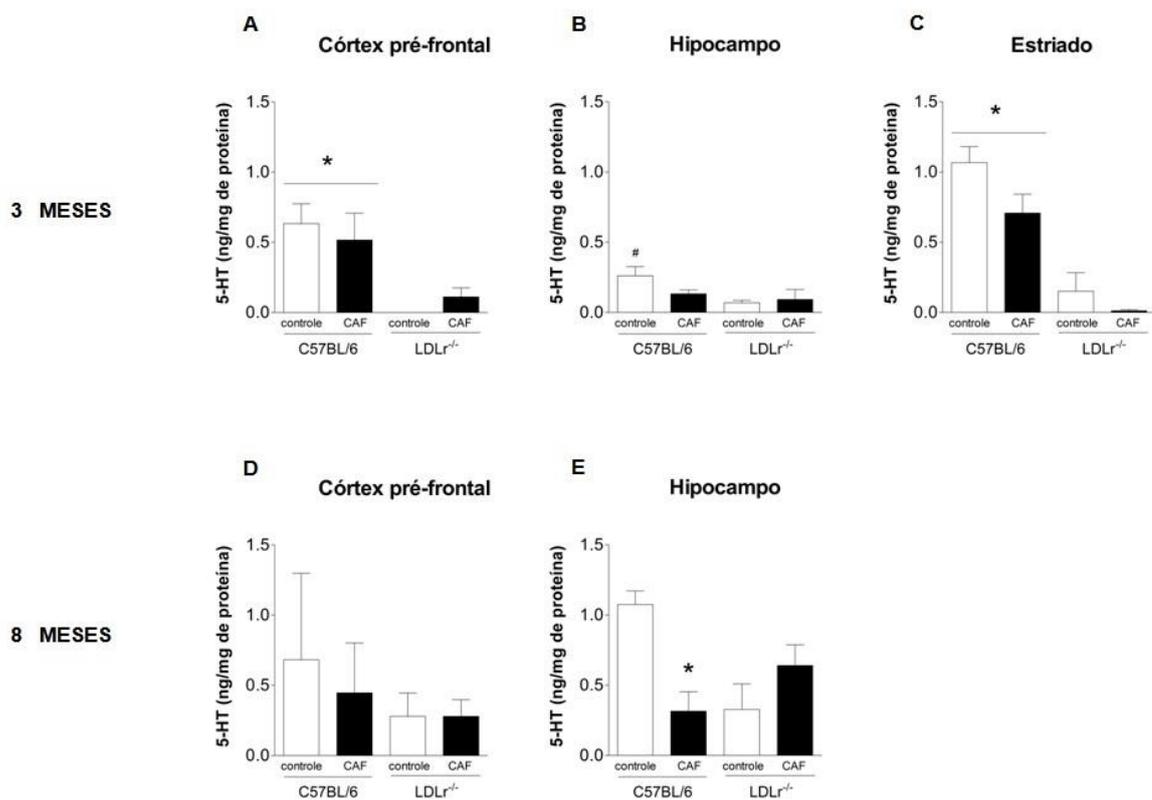


Figura 18. Efeitos do tratamento com cafeína (10 mg/kg, v. o.) sobre a concentração de serotonina (5-HT) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos de 3 meses (A-C) e 8 meses de idade (D e E) das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-}. As barras representam a média ± E. P. M. de 8 animais (3 meses de idade) e de 3 animais (8 meses de idade) por grupo (CAF: cafeína). #p ≤ 0,05 comparado ao grupo controle da linhagem LDLr^{-/-}. *p ≤ 0,05 comparado à linhagem LDLr^{-/-} ou ao grupo controle da mesma linhagem (8 meses).

5. DISCUSSÃO

Os resultados revelam, efeitos associados à idade, demonstrando de forma comparativa que os animais de 8 meses de idade apresentam déficits sobre a memória espacial e a memória aversiva de longo prazo que são independentes do tratamento ou linhagem. Foram revelados também, efeitos dependentes apenas de linhagem, em que os camundongos LDLr^{-/-} apresentaram déficits sobre a memória social de curto prazo e exibiram um comportamento do tipo depressivo sem alterações causadas pelo tratamento com a cafeína. No entanto, a cafeína causou efeitos dependentes de idade e de genótipo, sendo capaz de atenuar o comportamento de hiperlocomoção.

Os resultados obtidos no teste do campo aberto confirmam dados prévios da literatura demonstrando que os camundongos LDLr^{-/-} apresentam um aumento da atividade locomotora (ELDER et al., 2008), indicado pelo aumento dos parâmetros de distância total percorrida e velocidade média já aos 3 meses de idade e persistente até 8 meses. Corroborando estes resultados do campo aberto, o número de entradas nos braços fechados no teste do labirinto em cruz elevado, que também é utilizado como um parâmetro para avaliar a atividade locomotora (CRUZ et al., 1994), foi maior nos camundongos LDLr^{-/-} de 3 meses de idade, reforçando, assim, que esses animais exibem o já descrito padrão de hiperlocomoção.

Considerando isso, o resultado mais relevante observado no presente estudo foi o de que a hiperlocomoção dos camundongos LDLr^{-/-} com 8 meses de idade foi atenuada pelo tratamento crônico com a cafeína, sendo estes efeitos da cafeína independentes de modificações no perfil lipídico dos animais. Os resultados do teste do campo aberto revelaram que os camundongos LDLr^{-/-} de 8 meses de idade tratados com cafeína se locomoveram em velocidades médias menores, houve um decréscimo das distâncias percorridas, e também um menor número de entradas na região central, sem que houvesse, entre os grupos das duas linhagens testadas, mudanças no tempo de permanência na região central da arena.

Quanto ao tempo de permanência na área central da arena do campo aberto, não ficou evidente nenhum efeito significativo da administração de cafeína após 14 dias de tratamento, tanto para a linhagem C57BL/6 quanto para a linhagem LDLr^{-/-}, de ambas as idades. Como a área central em geral é considerada aversiva pelo animal (PRUT & BELZUNG, 2003), esse resultado é um indicativo de que o tratamento com cafeína na dose empregada não promoveu um aumento nas respostas relacionadas à ansiedade. Isto foi reforçado pelos resultados

obtidos no labirinto em cruz elevado, um teste sensível à investigação de efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de diferentes compostos (LISTER, 1987), em que o tratamento crônico com cafeína não alterou a exploração dos braços abertos em animais com 3 meses de idade de ambas as linhagens. Em conjunto, os resultados obtidos no campo aberto e no labirinto em cruz elevado não revelaram efeitos ansiogênicos devidos ao tratamento com a cafeína, indicando assim, que a atenuação da hiperlocomoção que foi observada, não é decorrente a um possível efeito secundário da cafeína que desencadeasse aumentos da ansiedade.

Como o esperado, os camundongos LDLr^{-/-} empregados neste estudo apresentaram níveis plasmáticos de colesterol elevados, em torno do dobro em comparação à linhagem controle C57BL/6, corroborando com dados da literatura (ISHIBASHI et al., 1993; OSONO et al., 1995; ZADELAAR et al., 2007). No entanto, foi observado que o tratamento crônico com cafeína não causou alterações no perfil lipídico nem flutuações do peso médio ao longo do mesmo período (dados não mostrados), em ambas as linhagens, considerando que os animais foram pesados diariamente no decorrer dos 21 dias de administração da cafeína.

Ao contrário de humanos, camundongos com deficiência do LDLR não desenvolvem arteriosclerose grave e os níveis plasmáticos de colesterol em dieta padrão ficam apenas o dobro dos níveis dos camundongos selvagens (ISHIBASHI et al., 1993). Considera-se também que a linhagem LDLr^{-/-} começa a desenvolver arteriosclerose em idades mais avançadas, acima dos 11 meses de idade, segundo Ishibashi et al. (1994). E a arteriosclerose nesses animais mais velhos é especialmente agravada quando expostos a uma dieta aterogênica (ISHIBASHI et al., 1994). Portanto, considerando a dieta e a idade dos animais deste estudo, podemos excluir que a atenuação da hiperlocomoção nos camundongos de 8 meses de idade foi devido a um quadro de hipercolesterolemia ou aterosclerose grave.

Em um trabalho desenvolvido por Mulder et al. (2004), camundongos LDLr^{-/-} machos de 6 meses de idade apresentaram um menor número de alternâncias espontâneas em comparação com camundongos LDLr^{+/+} no labirinto em T. Esta diminuição no número de alternâncias espontâneas no labirinto em T é um comportamento geralmente interpretado como um déficit de memória de trabalho e é dependente do hipocampo e do córtex pré-frontal (GERLAI, 1998). No entanto, no presente estudo, os camundongos (fêmeas de 8 meses de idade) que passaram pelo mesmo teste, não apresentaram prejuízos no desempenho deste teste e, conseqüentemente, a cafeína também não apresentou nenhum efeito significativo no número de alternâncias espontâneas.

Em relação à memória social de curto prazo, foi evidenciado um efeito dependente de genótipo, em que os camundongos LDLr^{-/-} de 8 meses de idade apresentaram um prejuízo de reconhecimento social em comparação aos selvagens, sendo que diferentemente dos animais da linhagem C57BL/6, os animais LDLr^{-/-}, independente do tratamento, apresentaram um tempo de investigação ao animal jovem na segunda apresentação semelhante ao tempo da primeira apresentação no teste de reconhecimento social, demonstrado por uma razão na duração de tempo de investigação que foi significativamente maior. Embora, neste estudo, o tratamento com a cafeína não tenha demonstrado efeitos sobre esse parâmetro, o resultado é o primeiro registro conhecido desse teste demonstrando déficits na memória social de curto prazo de camundongos LDLr^{-/-}.

Nesse sentido, trabalhos demonstram que o tratamento com cafeína é capaz de reverter déficits relacionados à idade em discriminação olfativa e memória de reconhecimento social (PREDIGER et al., 2005 b) e reverter prejuízos de memória social de curto prazo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (PREDIGER et al., 2005 c; TAKAHASHI et al., 2008). O fato da cafeína não ter apresentado efeitos sobre a memória social no presente estudo, pode ser em função de diferentes fatores, tais como, tipo de animal e linhagem, sexo, idade, a dose utilizada, de modo a ponderarmos que seriam necessárias doses mais elevadas de cafeína para promover alterações, além do mais, o regime crônico de tratamento pode diferir em seus efeitos quanto ao tratamento agudo empregado nos trabalhos citados.

A memória espacial de trabalho foi avaliada através do labirinto aquático. O hipocampo desempenha uma função primordial na navegação espacial e a memória de trabalho é de armazenamento temporário e se baseia em informações úteis para o raciocínio imediato que podem ser esquecidas, durando apenas de segundos a poucos minutos (IZQUIERDO & MEDINA, 1991). O córtex pré-frontal está envolvido nessa tarefa e desempenha um papel crítico no processamento da memória espacial (FAW, 2003). Foi verificado que a latência média de escape em encontrar a plataforma submersa no primeiro dia do teste foi semelhante para todos os grupos de ambas as idades, porém, em relação ao segundo dia, os animais das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} de 3 meses de idade, independente do tratamento, apresentaram tempos menores em encontrar a plataforma submersa (posicionada em um local diferente no segundo dia), demorando em torno da metade do tempo para encontrar a plataforma em relação à primeira exposição ao labirinto. O mesmo não foi observado para os animais de 8 meses de idade de ambas as linhagens, em que no

segundo dia continuaram apresentando latências elevadas, com exceção dos animais C57BL/6 tratados com cafeína.

Contudo, os resultados indicam que após 17 dias de tratamento, a cafeína não demonstrou efeitos associados à memória espacial de trabalho e que o fator idade parece ser o responsável principal pelos déficits de desempenho dos animais no labirinto aquático. O fato dos animais de 3 meses apresentarem uma latência menor que os animais de 8 meses apenas no segundo dia, pode estar muito mais relacionado à uma questão de habituação do que um baixo desempenho, sendo que foi apenas no segundo dia do teste que os camundongos de ambas as idades já haviam passado pela primeira experiência de nado no labirinto aquático.

A idade também pode ter influenciado sobre os resultados de memória aversiva de longo prazo dos animais, assim como a linhagem. No teste de esQUIVA INIBITÓRIA DO TIPO *step-down*, apenas os animais de 3 meses da linhagem C57BL/6, independente do tratamento, apresentaram latências maiores de esQUIVA INIBITÓRIA 24 h após o treino, demonstrando um claro comportamento relacionado à memória aversiva. No entanto, os animais de 8 meses, independente do tratamento, não apresentaram diferenças na latência após o estímulo elétrico 24 horas antes, demonstrando assim, déficits da memória aversiva de longo prazo. Este tipo de aprendizado relacionado à memória aversiva envolve estruturas como o hipocampo e o córtex pré-frontal e os efeitos comportamentais inerentes à esQUIVA INIBITÓRIA envolvem sentidos de percepção espacial e visual, sensibilidade à dor, acompanhados de componente emocional ligado a mecanismos de estresse (JERUSALINSKY et al., 1992). Dessa forma, os resultados indicam prejuízos relacionados aos aspectos da memória aversiva nos animais mais velhos, e a exemplo dos resultados obtidos no labirinto aquático, o tratamento com cafeína não foi capaz de reverter ou atenuar esses déficits de memória nos animais das linhagens C57BL/6 e LDLr^{-/-} de 8 meses de idade.

Os animais LDLr^{-/-} de 8 meses de idade apresentaram um comportamento do tipo depressivo, independente do tratamento, indicado pelo aumento no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda. Embora os animais de 3 meses de idade não tenham apresentado diferenças de imobilidade, os resultados de HPLC apóiam a presença de um comportamento do tipo depressivo nos animais LDLr^{-/-}, evidenciando diminuições significativas nos níveis de serotonina nos camundongos LDLr^{-/-} de 3 meses de idade em todas as três estruturas investigadas (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) em relação à linhagem C57BL/6. Amostras de tecido insuficientes podem ter sido responsáveis pela não reprodução de resultados similares quanto aos níveis de serotonina por HPLC nos animais de

8 meses de idade. A rigor, também não podemos associar a atenuação da hiperlocomoção dos animais LDLr^{-/-} de 8 meses de idade com possíveis efeitos do tipo depressivo causados pela cafeína, considerando que o grupo controle apresentou um tempo de imobilidade similar.

Somado a isso, tanto os animais de 3 meses como os de 8 meses de idade não apresentaram alterações significativas nos níveis de dopamina. Conforme Yin et al. (2014), fortes evidências mostram que a cafeína exerce efeitos do tipo antidepressivo em condições de estresse, através de um aumento nos níveis de dopamina no encéfalo. Dessa forma, se considerarmos o regime de gavagem, pelo qual os animais foram tratados oralmente, como um fator estressor, possíveis diminuições não detectadas nos níveis de dopamina poderiam estar mascarados pelo tratamento crônico através de uma modulação desses níveis pela cafeína.

Corroborando os resultados de HPLC quanto aos níveis de dopamina no estriado, a técnica de imunodeteção não revelou diferenças na expressão estriatal da enzima TH, que representa a enzima limitante na síntese de catecolaminas, incluindo a dopamina. Isso é um indicativo de que a hiperlocomoção nesses camundongos LDLr^{-/-} não está relacionado a um aumento na produção de dopamina na via nigroestriatal e que a cafeína não alterou essa produção.

Moreira et al. (2012 a) evidenciaram um aumento da atividade da enzima AChE no córtex pré-frontal de camundongos LDLr^{-/-} machos de 3 meses de idade. No presente estudo, os resultados indicaram que os animais LDLr^{-/-} fêmeas de 3 meses apresentaram uma atividade similar da AChE no córtex pré-frontal. O dado mais importante, porém, revela que os animais LDLr^{-/-} de 3 meses tratados com cafeína apresentaram uma queda na atividade da AChE diferindo de modo significativo da linhagem C57BL/6. Em relação à linhagem C57BL/6 de 3 meses de idade, o tratamento com a cafeína causou um aumento significativo da atividade da AChE no hipocampo, mas não há indícios da ligação desse resultado com os dados obtidos através dos testes comportamentais.

Embora Moreira e colaboradores (2012 a), não tenham utilizado camundongos com 8 meses de idade, foi evidenciado aumentos na atividade da AChE no córtex pré-frontal de camundongos LDLr^{-/-} de 3 e 14 meses de idade, sugerindo que essa atividade aumentada pode continuar a partir dos 3 meses até os 14 meses de idade. No entanto, para os animais de 8 meses de idade do presente estudo, em geral todos os grupos apresentaram reduções da atividade da AChE em comparação com os animais de 3 meses, sendo que não houve diferenças entre os grupos nessa idade. Os resultados não apresentem evidências suficientes

para apoiar que o tratamento com cafeína inibiu a atividade da AChE nos animais de 8 meses, mesmo esta apresentando uma tendência de queda no córtex pré-frontal e hipocampo e considerando que os animais LDLr^{-/-} de 3 meses tratados com cafeína exibiram uma queda da atividade no córtex pré-frontal. Entretanto investigações futuras sobre esse tema parecem ser importantes, considerando que evidências recentes mostram que a cafeína pode agir como um inibidor não competitivo da AChE em humanos (POHANKA & DOBES, 2013).

Contudo, o resultado mais relevante foi de que o pré-tratamento de 14 dias com a cafeína atenuou a hiperlocomoção dos camundongos LDLr^{-/-} de 8 meses de idade. É possível hipotetizar que a atenuação da atividade locomotora não foi verificada nos animais da mesma linhagem com 3 meses de idade em razão da hiperlocomoção ser mais robusta, requerendo o tratamento com doses superiores ou períodos mais prolongados de cafeína.

Nosso laboratório já demonstrou anteriormente uma atividade locomotora aumentada nos animais LDLr^{-/-}, testando animais de 3 e 14 meses de idade foi verificado um aumento no número de quadrantes atravessados no campo aberto (MOREIRA et al., 2012 a). No presente estudo, além de evidenciarmos a hiperlocomoção e a atenuação dessa condição nos camundongos LDLr^{-/-} através de um pré-tratamento crônico com cafeína, demonstramos que esse efeito não está ligado à ansiedade. No estudo conduzido por Elder et al. (2008), a atividade locomotora aumentada nos LDLr^{-/-} também não foi interpretada como sendo um efeito relacionado a estados de ansiedade alterados, considerando que no teste do campo aberto daquele estudo, ambas as linhagens (LDLr^{-/-} e C57BL/6) passaram quantidades comparáveis de tempo no centro do campo aberto. Além do mais, os pesquisadores confirmaram posteriormente, através de testes comportamentais adicionais (teste da caixa clara/escuro; teste do labirinto em zero elevado), a ausência de alterações em parâmetros relacionados à ansiedade, caracterizando, assim, a hiperlocomoção dos LDLr^{-/-}, independentemente da dieta, como um comportamento próprio dependente do genótipo (ELDER et al., 2008).

No presente trabalho também não houve alterações do perfil lipídico dos animais pelo tratamento com a cafeína e não há indicação de que a atenuação da hiperlocomoção nos camundongos LDLr^{-/-} de 8 meses de idade está ligada a um quadro hipercolesterolêmico ou de aterosclerose grave. Isso é importante, porque evidencia que a hiperlocomoção é independente do perfil lipídico, uma vez que a cafeína altera a locomoção sem alterar o perfil lipídico. Embora nem todos os estudos observaram comportamentos relacionados à uma atividade locomotora aumentada nos camundongos LDLr^{-/-}, segundo Elder et al. (2008), a presença de

hiperlocomoção nos animais LDLr^{-/-} parece indicar a presença de uma hiperatividade generalizada. Isso sugere, no âmbito fisiológico, que o receptor de LDL é capaz de regular um nível geral de tônus motor, que é independente da ansiedade, e que a ausência do receptor conduz à uma certa hiperatividade responsiva a pelo menos alguns estímulos sensoriais externos (ELDER et al., 2008).

Como perspectivas para o futuro, seria interessante investigar mais a fundo a importância e o real impacto do LDLR sobre o comportamento, analisando, por exemplo, se os déficits de memória observados neste trabalho poderiam ser melhorados através de um aumento da expressão do LDLR no cérebro. Bem como, investigar as consequências na atividade locomotora relacionadas a diminuições ou aumentos da atividade do receptor, tanto no sistema nervoso central como no periférico, e qual seriam os efeitos de um tratamento com cafeína considerando esse quadro. E considerando que este trabalho revelou um efeito de atenuação da hiperlocomoção, que é dependente de idade e devida a uma concentração determinada de cafeína, seria importante estudos explorando idades diferentes além de 3 e 8 meses, assim como diferentes concentrações e extensões de tempo do tratamento com a cafeína.

Além disso, embora a ausência do LDLR funcional apresente um efeito limitado sobre os níveis de lipoproteínas plasmáticas nos camundongos nocautes que são alimentados com uma dieta padrão, seria interessante investigar questões sobre a atividade locomotora ou cognitiva de pacientes portadores de hipercolesterolemia familiar. E apesar de verificarmos neste trabalho, que a hiperlocomoção não está associada ao perfil lipídico dos camundongos LDLr^{-/-}, talvez seja interessante, além de confirmar os resultados obtidos, submeter os camundongos LDLr^{-/-} a uma dieta hipercolesterolêmica acompanhada de um tratamento crônico com cafeína, de modo a tentar compreender em quais circunstâncias ou até que ponto o tratamento com cafeína é capaz de atenuar ou reverter a hiperlocomoção.

E por fim, além da cafeína, outras substâncias poderiam assumir o seu papel ou tomar parte em conjunto na investigação do LDLR, como verificar o efeito das estatinas na expressão e atividade do LDLR no cérebro e suas implicações sobre as funções cognitivas e locomotoras. Isso leva em consideração a descoberta de que as estatinas podem regular os níveis de mRNA do LDLR (O'NEILL et al., 2001), além disso, as estatinas se mostram como possíveis agentes protetores contra a doença de Alzheimer (CRISBY et al., 2002). Dessa forma, além de uma compreensão mais aprofundada do papel do LDLR, teríamos a chance de

testar novas maneiras para projetar terapias para doenças neurodegenerativas, em especial, a doença de Alzheimer.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que a cafeína administrada em um regime crônico é capaz de alterar estados comportamentais relacionados à atividade locomotora, resultando em atenuação da hiperlocomoção, sendo este efeito, dependente da idade. As ações da administração oral da cafeína se mostraram independentes de efeitos adversos relacionados à ansiedade ou quanto ao perfil lipídico, podendo promover alterações bioquímicas no SNC em animais nocautes para o LDLR ou selvagens. E finalmente, que a hiperlocomoção não está ligada ao perfil lipídico dos camundongos da linhagem LDLR^{-/-}, demonstrando que o LDLR influencia no tônus motor animal.

REFERÊNCIAS

AKILLIOGLU, K.; MELIK E. B.; MELIK E.; BOGA A.; Effect of ketamine on exploratory behaviour in BALB/C and C57BL/6 mice; **Pharmacology Biochemistry and Behavior**; v. 3; p. 513-517; 2012.

ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behav Brain Res**, v. 204, n. 1, p. 206-11, Dec 1 2009.

BARONE, J. J.; ROBERTS, H. R.; Caffeine consumption; **Fd Chem Tox**; v. 34; p. 119-129; 1996.

BEFFERT, U.; DANIK, M.; KRZYWKOWSKI, P.; RAMASSAMY, C.; BERRADA, F.; POIRIER, J.; The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease; **Brain Res.**; v. 27; p. 119-142; 1998.

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.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L.; A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis; **Science**; v. 232; p. 34-47; 1986.

CAO, D.; FUKUCHI, K.; WAN, H.; KIM, H.; LI, L.; Lack of LDL receptor aggravates learning deficits and amyloid deposits in Alzheimer transgenic mice; **Neurobiol Aging**; v. 27; p. 1632-1643; 2006.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B.; Glutathione reductase. **Methods Enzymol**; v. 113; p. 484-490; 1985.

CASTRO, A. A.; WIEMES, B. P.; MATHEUS, F. C.; LAPA, F. R.; VIOLA, G. G.; SANTOS, A. R.; TASCA, C. I.; PREDIGER, R. D.; Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease; **Brain Res.**; v. 1513; p. 103-116; 2013.

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; **Journal of Neuroscience**; v. 21, n. 10, p. RC143; 2001.

CHEN, J.; ZHANG, Z. G.; LI, Y.; WANG, Y.; WANG, L.; JIANG, H.; ZHANG, C.; LU, M.; KATAKOWSKI, M.; FELDKAMP, C. S.; CHOPP, M.; Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke; **Ann. Neurol.**; v. 53; p. 743-751; 2003.

CHEN J. F.; SONSALLA, P. K.; PEDATA, F.; MELANI, A.; DOMENICI, M. R.; POPOLI, P.; GEIGER, J.; LOPES, L. V.; DE MENDONCA, A.; Adenosine A2A receptors and brain injury: broad spectrum of neuroprotection, multifaceted actions and “fine tuning” modulation; **Prog Neurobiol**; v. 83; p. 310-331; 2007.

CLARKSON, P. M.; Nutritional ergogenic aids: caffeine; **J Sports Nutr**; v. 3; p. 103-111; 1993.

CORDER, E. H.; SAUNDERS, A. M.; STRITTMATTER, W. J.; SCHMECHEL, D. E.; GASKELL, P. C.; SMALL, G. W.; ROSES, A. D.; HAINES, J. L.; PERICAK-VANCE, M. A.; Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer`s disease in late onset families; **Science**; v. 261; p. 921-923; 1993.

CRISBY, M.; CARLSON, L. A.; WINBLAD, B.; Statins in the prevention and treatment of Alzheimer disease; **Alzheimer Dis Assoc Disord**; v. 16; p. 131-136; 2002.

CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G.; Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze; **Pharmacol Biochem Behav.**; v. 49; p. 171-176; 1994.

CRYAN, J. F.; MOMBЕРЕAU, C.; VASSOUT, A.; The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci. & Biobehav. Rev.**; v. 29; p. 571-625; 2005.

CUNHA, R. A.; Caffeine, adenosine receptors, memory and alzheimer disease. **Med. Clin. (Barc.)**; v. 131; p. 790-795; 2008.

CUNHA, R. A.; Neuroprotection by adenosine in the brain: from A1 receptor activation to A2A receptor blockade. **Purinergic Signal**. v. 1; p. 111-134; 2005.

DA SILVA, R. S.; HOFFMAN, A.; DE SOUZA, D. O.; LARA, D. R.; BONAN, C. D.; Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats; **European Journal of Pharmacology**; v. 509, p. 155-159; 2005.

DANTZER, R.; BLUTHE, R. M.; KOOB, G. F.; LE MOAL, M.; Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology**; v. 91; p. 363-368; 1987.

DAVIS, J. M.; ZHAO, Z.; STOCK, H. S.; MEHL, K. A.; BUGGY, J.; HAND, G. A.; Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**; v. 284, p. 399-404; 2003.

DE OLIVEIRA, J.; HORT, M. A.; MOREIRA, E. L.; GLASER, V.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; PREDIGER, R. D.; FARINA, M.; LATINI, A.; DE BEM, A. F.; Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: Relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress; **J Neuroscience**; v. 197; p. 99-106; 2011.

DE OLIVEIRA, J.; MOREIRA, E. L.; DOS SANTOS, D. B.; PIERMARTIRI, T. C.; DUTRA, R. C.; PINTON, S.; TASCA, C. I.; FARINA, M.; PREDIGER, R. D.; DE BEM, A. F.; Increased susceptibility to amyloid- β -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor; **J Alzheimers Dis.**; v. 41; p. 43-60; 2014.

DELLU, F.; MAYO, W.; CHERKAOUI, J.; LE MOAL, M.; SIMON, H.; A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats; **Brain Res**; 588; p. 132-139; 1992.

DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D.; Thematic review series: brain lipids cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal; **J Lipid Res**; v. 45; p. 1375-1397; 2004.

DUNKLEY, P. R.; JARVIE, P. E.; ROBINSON, P. J.; A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes; **Nat Protoc**; v. 3; p. 1718-1728; 2008.

EASTWOOD, S. L.; HARRISON, P. J.; Synaptic pathology in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and mood disorders. A review and a Western blot study of synaptophysin, GAP-43 and the complexions; **Brain Research Bulletin**, v. 55; p. 569-578; 2001.

ELDER, G. A.; RAGNAUTH, A.; DORR, N.; FRANCIOSI, S.; SCHMEIDLER, J.; HAROUTUNIAN, V.; BUXBAUM, J. D.; Increased locomotor activity in mice lacking the low density lipoprotein receptor; **Behav Brain Res**; v. 191; p. 256-265; 2008.

ELLMAN, G. L.; Tissue sulfhydryl groups; **Arch Biochem Biophys**, v. 82, p. 70-77; 1959.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. JR.; FEATHER-STONE, R. M.; A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity; **Biochem Pharmacol**; v. 7; p. 88-95; 1961.

EVANS, R. M.; EMSLEY, C. L.; GAO, S.; SAHOTA, A.; HALL, K. S.; FARLOW, M. R.; HENDRIE, H.; Serum cholesterol, APOE genotype, and the risk of alzheimer's disease: a population-based study of African Americans; **Neurology**; v. 54; p. 240-242; 2000.

FAW, B.; Pre-frontal executive committee for perception, working memory, attention, long-term memory, motor control, and thinking: a tutorial review; **Conscious Cogn**; v. 12; p. 83-139; 2003.

FREDHOLM, B. B.; BÄTTIG, 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.

FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; KLOTZ, K. N.; LINDEN, J.; Nomenclature and classification of adenosine receptors; **Pharmacol Rev**, v. 53; p. 527-552; 2001.

FRYE, C. A.; WALF, A. A.; Progesterone to ovariectomized mice enhances cognitive performance in the spontaneous alternation, object recognition, but not placement, water maze, and contextual and cued conditioned fear tasks. **Neurobiol Learn Mem**; v. 90, p. 171-177; 2008.

GERHARDT, A. L. & GALLO, N. B.; Full-fat rice bran and oat bran similarly reduce hypercholesterolemia in humans. **J. Nutr**; v. 128, p. 865-869; 1998.

GERLAI, R.; A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice: A strain comparison and lesion study; **Behav Brain Res**; v. 95; p. 91-101; 1998.

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

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; Familial hypercholesterolaemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS & Valle D (Editors); **The Metabolic Basis of Inherited Disease**; 6th edn. McGraw-Hill; New York; p. 1215-1250; 1989.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; History of Discovery: the LDL receptor; **Arterioscler Thromb Vasc Biol**; v. 29; p. 431-438; 2009.

GOMES, M. R.; TOMASO, H.; NAZARIAN, G. K.; BJARNASON, H.; DIETZ, C. A. JR.; HUNTER, D. W.; Upper-extremity deep vein thrombosis and chronic pulmonary embolism resulting in pulmonary artery hypertension; **AJR Am J Roentgenol**; v. 170, p. 1532-1534, 1998.

HERZ, J.; GOTTHARDT, M.; WILLNOW, T. E.; Cellular signaling by lipoprotein receptors; **Curr Opin Lipidol**; v. 11; p. 161-166; 2000.

HERZ, J.; BOCK, H. H.; Lipoprotein receptors in the nervous system; **Rev Biochem**; v. 71; p. 405-434; 2002.

HOBBS, H. H.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L.; Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia; **Human Mutation**; v. 1; p. 445-466; 1992.

HOLLINGWORTH, H.; The influence of caffeine on mental and motor efficiency; **The Science press**; New York; 1912.

IGBAVBOA, U.; AVDULOV, N. A.; CHOCHINA, S. V.; WOOD, W. G.; Transbilayer distribution of cholesterol is modified in brain synaptic plasma membranes of knockout mice deficient in the low-density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins; **J Neurochem**; v. 69; p. 1661-1667; 1997.

INNERARITY, T. L.; MAHLEY, R. W.; Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins; **Biochemistry**; v. 17; p. 1440-1447; 1978.

ISHIBASHI, S.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L.; GERARD, R. D.; HAMMER, R. E.; HERZ, J.; Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery; **J Clin Invest**; v. 92; p. 883-893; 1993.

ISHIBASHI, S.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; HERZ, J.; BURNS, D. K.; Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice; **J Clin Invest**; v. 93; p. 1885-1893; 1994.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **Trends Pharmacol Sci**; v. 12; p. 260-265; 1991.

IZQUIERDO, I.; Memória; Porto Alegre; Artmed; 2002.

JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M. B.; WALZ, R.; DA SILVA, R. C.; BIANCHIN, M.; RUSCHEL, A. C.; ZANATTA, M. S.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex; **Behav Neural Biol**; v. 58; p. 76-80; 1992.

JOGHATAIE, M. T.; ROGHANI, M.; NEGAHDAR, F.; HASHEMI, L.; Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence; **Parkinsonism and Related Disorders**, Vol. 10, p. 465–468; 2004.

KIM, J.; CASTELLANO, J. M.; JIANG, H.; BASAK, J. M.; PARSADANIAN, M.; PHAM, V.; MASON, S. M.; PAUL, S. M.; HOLTZMAN, D. M.; Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance; **Neuron**; v. 64; p. 632-644; 2009.

KIVIPELTO M, HELKALA EL, HANNINEN T, LAAKSO MP, HALLIKAINEN M, ALHAINEN K, SOININEN H, TUOMILEHTO J, NISSINEN, A; Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study; **Neurology**; v. 56; p. 1683-1689; 2001.

LISTER, R. G.; The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**; v. 92; p. 180-185; 1987.

LONGO, F. M.; YANG, T.; XIE, Y.; MASSA, S. M.; Small molecule approaches for promoting neurogenesis; **Alzheimer Res**; v. 3; p. 5-10; 2006.

MAHAN, L. K.; SCOTT-STUMP, K.; **Alimentos, nutrição e dietoterapia**; São Paulo; ROCA; 1998.

MAIA, L.; DE MENDONCA, A.; Does caffeine intake protect from alzheimer's disease? **Eur J Neurol**; v. 9; p. 377-382; 2002.

MASLIAH, E.; MALLORY, M.; GE, N.; ALFORD, M.; VEINBERGS, I.; ROSES, A. D.; Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice; **Exp. Neurol.**; v. 136; p. 107-122; 1995.

MOHAMMAD, F.K.; DAWOOD, K. A.; AL-DABBAGH, S. G.; Antagonism of medetomidine-induced ataxia in rats by yohimbine, aminophylline and caffeine; **Pharmacol Res.**; v. 27; p. 81-88; 1993.

MOREIRA, E. L.; DE OLIVEIRA, J.; NUNES, J. C.; SANTOS, D. B.; NUNES, F. C.; VIEIRA, D. S.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; PAMPLONA, F. A.; DE BEM, A. F.; FARINA, M.; WALZ, R.; PREDIGER, R. D.; Age-related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}): evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. **J Alzheimers Dis**; v. 32; p. 495-511; 2012 a.

MOREIRA, E. L.; DE OLIVEIRA, J.; DUTRA, M.; SANTOS, D.; GONÇALVES, C.; GOLDFEDER, E.; DE BEM, A.; PREDIGER, R. D.; ASCHNER, M.; FARINA, M.; Does methylmercury-induced hypercholesterolemia play a causal role in its neurotoxicity and cardiovascular disease?; **Toxicological Sciences**; v. 130; p. 373-382; 2012 b.

MOREIRA, E. L.; AGUIAR, A. S. JR.; DE CARVALHO, C. R.; SANTOS, D. B.; DE OLIVEIRA, J.; DE BEM, A. F.; XIKOTA, J. C.; WALZ, R.; FARINA, M.; PREDIGER, R. D.; Effects of lifestyle modifications on cognitive impairments in a mouse model of hypercholesterolemia; **Neuroscience Letters**; v. 29; p. 541-193; 2013.

MOREIRA, E. L.; DE OLIVEIRA, J.; ENGEL, D. F.; WALZ, R.; DE BEM, A. F.; FARINA, M.; PREDIGER, R. D.; Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event?; **J Neural Transm**; v. 121; p. 415-426; 2014.

MITCHELL, N. C.; GOULD, G. G.; SMOLIK, C. M.; KOEK, W.; DAWS, L. C.; Antidepressant-like drug effects in juvenile and adolescent mice in the tail suspension test: Relationship with hippocampal serotonin and norepinephrine transporter expression and function. **Front. Pharmacol.**; v. 04; p. 131; 2013.

MULDER, M.; JANSEN, P. J.; JANSSEN, B. J.; VAN DE BERG, W. D.; VAN DER BOOM, H.; HAVEKES, L. M.; DE KLOET, R. E.; RAMAEKERS, F. C.; BLOKLAND, A.; Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus; **Neurobiol Dis**; v. 16; p. 212-219; 2004.

MULDER, M.; KOOPMANS, G.; WASSINK, G.; AL MANSOURI, G.; SIMARD, M. L.; HAVEKES, L. M.; PRICKAERTS, J.; BLOKLAND, A.; LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus; *Neurosci Res*; v. 59; p. 251-256; 2007.

MUNZEL T, GORI, T.; BRUNO, R. M.; TADDEI, S.; Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease?; **Eur Heart J**; v. 31; p. 2741-2748; 2010.

NEHLIG, A.; Coffee, tea, chocolate, and the brain; ed. I; **CRC Press**; Boca Raton; 2004.

NEHLIG, A.; Is Caffeine a Cognitive Enhancer?; **J of Alzheimer's Disease**; v. 20; p. S85-S94; 2010 a.

NEHLIG, A.; ARMSPACH, J. P.; NAMER, I. J.; SPECT assessment of brain activation induced by caffeine: no effect on areas involved in dependence; **Dialogues Clin Neurosci**; 12; p. 255-263; 2010 b.

O'NEILL, F. H.; PATEL, D. D.; KNIGHT, B. L.; NEUWIRTH, C. K.; BOURBON, M.; SOUTAR, A. K.; TAYLOR, G. W.; THOMPSON, G. R.; NAOUMOVA, R. P.; Determinants of variable response to statin treatment in patients with refractory familial hypercholesterolemia; **Arterioscler Thromb Vasc Biol**; v. 21; p. 832-837; 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K.; Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction; **Anal Biochem**; v. 95; p. 351-358; 1979.

OSONO, Y.; WOOLLETT, L. A.; HERZ, J.; DIETSCHY, J. M.; Role of the low-density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse; **J Clin Invest**; v. 95; p. 1124-1132; 1995.

PANDOLFO, P.; MACHADO, N. J.; KÖFALVI, A.; TAKAHASHI, R. N.; CUNHA, R. A.; Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder; **Eur Neuropsychopharmacol.**; v. 23; p. 317-328; 2013.

PAVLOV, O. V.; BOBRYSHV Yu. V.; ASHWELL K.; An in vitro study of the effects of lovastatin on human fetal brain cells; **Neurotoxicol Teratol**; v. 17; p. 31-39; 1995.

PIRES, V. A.; PAMPLONA, F. A.; PANDOLFO, P.; PREDIGER, R. D.; TAKAHASHI, R. N.; Chronic caffeine treatment during prepubertal period confers long-term cognitive benefits in adult spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) **Behavioural Brain Research**; v. 215; p. 39-44; 2010.

POHANKA, M.; DOBES P.; Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase; **Int J Mol Sci**; v. 14; p. 9873-9882; 2013.

PREDIGER, R. D.; AGUIAR, A. S. JR.; ROJAS-MAYORQUIN, A. E.; FIGUEIREDO, C. P.; MATHEUS, F. C.; GINESTET, L.; CHEVARIN, C.; BEL, E. D.; MONGEAU, R.; HAMON, M.; LANFUMEY, L.; RAISMAN-VOZARI, R.; Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease; **Neurotox Res**; v. 17; p. 114-129; 2010.

PREDIGER, R. D. S.; PAMPLONA, F. A.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI R. N.; Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) – the spontaneously hypertensive rat (SHR); **International J. Neuropsychopharmacology**; 2005 a.

PREDIGER, R. D. S.; 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. **Neurobiology of Aging**; v. 26, p. 957-964; 2005 b.

PREDIGER, R. D. S.; 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; 2005 c.

PREDIGER, R. D.; AGUIAR, A. S. JR.; ROJAS-MAYORQUIN, A. E.; FIGUEIREDO, C. P.; MATHEUS, F. C.; GINESTET, L.; CHEVARIN, C.; BEL, E. D.; MONGEAU, R.; HAMON, M.; LANFUMEY, L.; RAISMAN-VOZARI, R.; Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease; **Neurotox Res**; v. 17; p. 114-129; 2010.

PRUT, L.; BELZUNG, C.; The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review; **Eur J Pharmacol**; v. 463; p. 3-33; 2003.

RENSSEN, P. C.; HERIJGERS, N.; NETSCHER, M. H.; MESKERS, S. C.; VAN ECK, M.; VAN BERKEL, T. J.; Particle size determines the specificity of apolipoprotein E-containing triglyceride-rich emulsions for the LDL receptor versus hepatic remnant receptor in vivo; **J Lipid Res**; v. 38; p. 1070-1084; 1997.

ROBBINS, S. L.; **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan; 1991.

ROSSI, S.; DE CHIARA, V.; MUSELLA, A.; MATALUNI, G.; SACCHETTI, L.; SIRACUSANO, A.; BERNARDI, G.; USIELLO, A.; CENTONZE, D.; Caffeine drinking potentiates cannabinoid transmission in the striatum: interaction with stress effects; **Neuropharmacology**; v.56; p. 590-597; 2009.

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A.; Adenosine receptors and the central nervous system; **Handb Exp Pharmacol**; v. 193; p. 471-534; 2009.

SHANKARAN, M.; KING, C.; LEE, J.; BUSCH, R.; WOLFF, M.; HELLERSTEIN, M. K.; Discovery of novel hippocampal neurogenic agents by using an in vivo stable isotope labeling technique; **J Pharmacol Exp Ther**; v. 319; p. 1172-1181; 2006.

SILVA, R. S.; HOFFMAN, A. S.; LARA, D. R.; BONAN, C. D.; Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats. **Eur J Pharmacol**, v. 509, p. 155-159; 2005.

SILVA, C. G.; SILVA, C. G.; MÉTIN, C.; FAZELI, W.; MACHADO, N. J.; DARMOPIL, S.; LAUNAY, P. S.; GHESTEM, A.; NESA, M. P.; BASSOT, E.; SZABÓ, E.; BAQI, Y.; MÜLLER, C. E.; TOMÉ, A. R.; IVANOV, A.; ISBRANDT, D.; ZILBERTER, Y.; CUNHA, R. A.; ESCLAPEZ, M.; BERNARD, C.; Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice; **Sci Transl Med**; v. 5; 2013.

SINCLAIR, C. J. D.; GEIGER, J. D.; Caffeine use in sports: a pharmacological review. **J Sports Med Phys Fit**; v. 40; p. 71-79; 2002.

SLAVIN, N.; JOENSEN, H. K.; Caffeine and sport performance; **Phys Sports Med**; v. 13, p. 191-193; 1995.

SOLINAS, M.; FERRÉ, S.; YOU, Z. B.; KARCZ-KUBICHA, M.; POPOLI, P.; GOLDBERG, S. R.; Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. **J. Neurosci**; v. 22; p. 6321-6324; 2002.

SPRIET, L. S.; Caffeine and performance. **Int J Sports Nutr**; v. 5, p. 84-99; 1995.

TAKAHASHI, R. N.; PAMPLONA, F. A.; PREDIGER, R. D. S.; Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies; **Front. Biosci.**; v. 13; p. 2614-2632; 2008.

THE NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE: **Executive Summary of Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults**. Endereço: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/index.htm>. Acesso em: 01 de outubro de 2013.

UYAMA, O; OKAMURA, N; YANASE, M; NARITA, M; KAWABATA, K; SUGITA, M. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using evans blue fluorescence; **J Cereb Blood Flow Metab**; v. 8; p. 282-284; 1988.

VALTORTA, F.; PENNUTO, M.; BONANOMI, D.; BENFENATI, F.; Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? **Bioessays**; v. 26; p. 445-453; 2004.

VAN GELDER, B. M.; BUIJSSE, B.; TIJHUIS, M.; KALMIJN, S.; GIAMPAOLI, S.; NISSINEN, A.; KROMHOUT, D.; Coffee consumption is inversely associated with cognitive decline in elderly European men: the FINE Study; **Eur J Clin Nutr**; v. 61; p. 226-232; 2007.

XAVIER, H. T.; IZAR, M. C.; FARIA NETO, J. R.; ASSAD, M. H.; ROCHA, V. Z.; SPOSITO, A. C.; FONSECA, F. A.; DOS SANTOS, J. E.; SANTOS, R. D.; BERTOLAMI, M. C.; FALUDI, A. A.; MARTINEZ, T. L. R.; DIAMENT, J.; GUIMARÃES, A.; FORTI, N. A.; MORIGUCHI, E.; CHAGAS, A. C. P.; COELHO, O. R.; RAMIRES, J. A. F.; **V diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose**; 2013. Endereço: <http://www.cientifico.cardiol.br>. Acesso em: 14 de março de 2015.

WENDEL, A.; Glutathione peroxidase; **Methods Enzymol**; v. 77; p. 325-333; 1981.

WHITMER, R. A.; SIDNEY, S.; SELBY, J.; JOHNSTON, S. C.; YAFFE, K.; Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in later life; **Neurology**; v. 64; p. 277-281; 2005.

YAFFE, K.; BARRETT-CONNOR, E.; LIN, F.; GRADY, D.; Serum lipoprotein levels, statin use, and cognitive function in older women; **Arch Neurol**; v. 59; p. 378-384; 2002.

YIN, Y. Q.; ZHANG, C.; WANG, J. X.; HOU, J.; YANG, X.; QIN, J.; Chronic caffeine treatment enhances the resilience to social defeat stress in mice; **Food Funct.**; v. 6; p. 479-91; 2014.

ZADELAAR, S.; KLEEMANN, R.; VERSCHUREN, L.; DE VRIES-VAN DER WEIJ, J.; VAN DER HOORN, J.; PRINCEN, H. M.; KOOISTRA, T.; Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers; **Arterioscler Thromb Vasc Biol**; v. 27; p. 1706-1721; 2007.