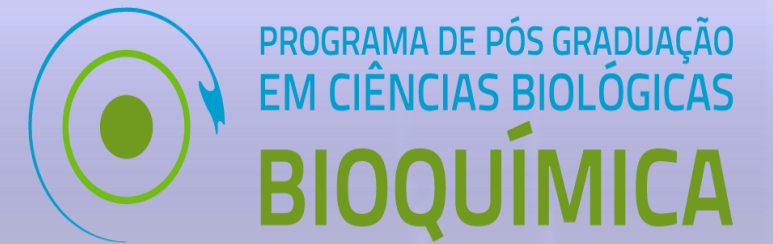


# Investigação dos efeitos neuroquímicos e comportamentais do tratamento crônico de cafeína em animais submetidos à bulsectomia olfatória bilateral



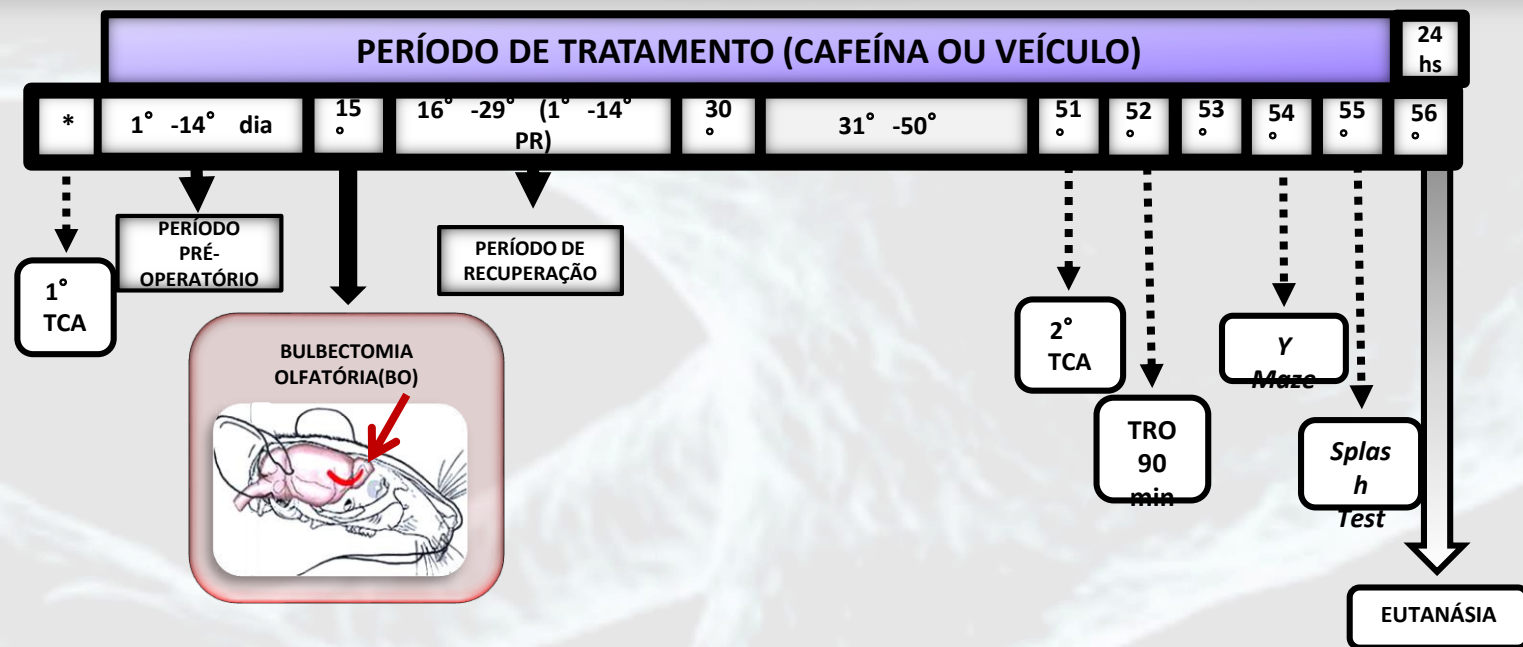
Marcus Vinicius Soares de Lara<sup>1</sup>, Lisiane de Oliveira Porciúncula<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Bioquímica



## Introdução e Objetivos

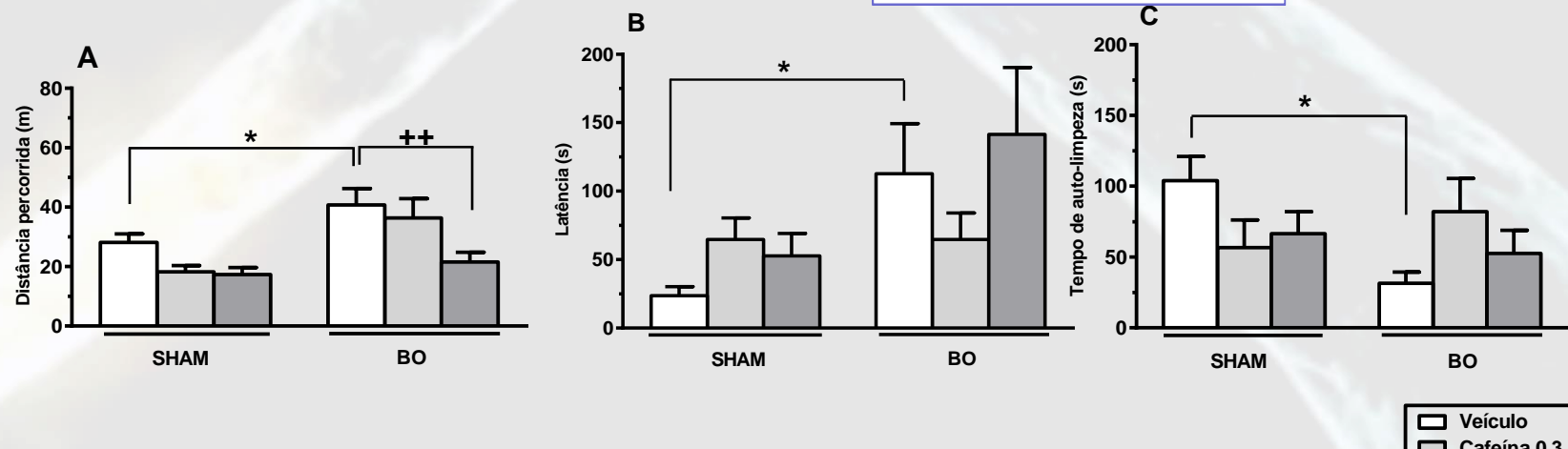
A cafeína é o psicoestimulante mais consumido no mundo, cuja ação está relacionada ao bloqueio não seletivo dos receptores de adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>. Em estudos epidemiológicos foi encontrada uma associação entre menor risco de depressão com maior consumo de café. A bulsectomia olfatória (BO) é um modelo animal de depressão com alterações comportamentais e neuroquímicas semelhantes às de pacientes deprimidos. Portanto, nosso objetivo foi investigar o impacto da administração de duas doses de cafeína sobre alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela BO.

## Métodos

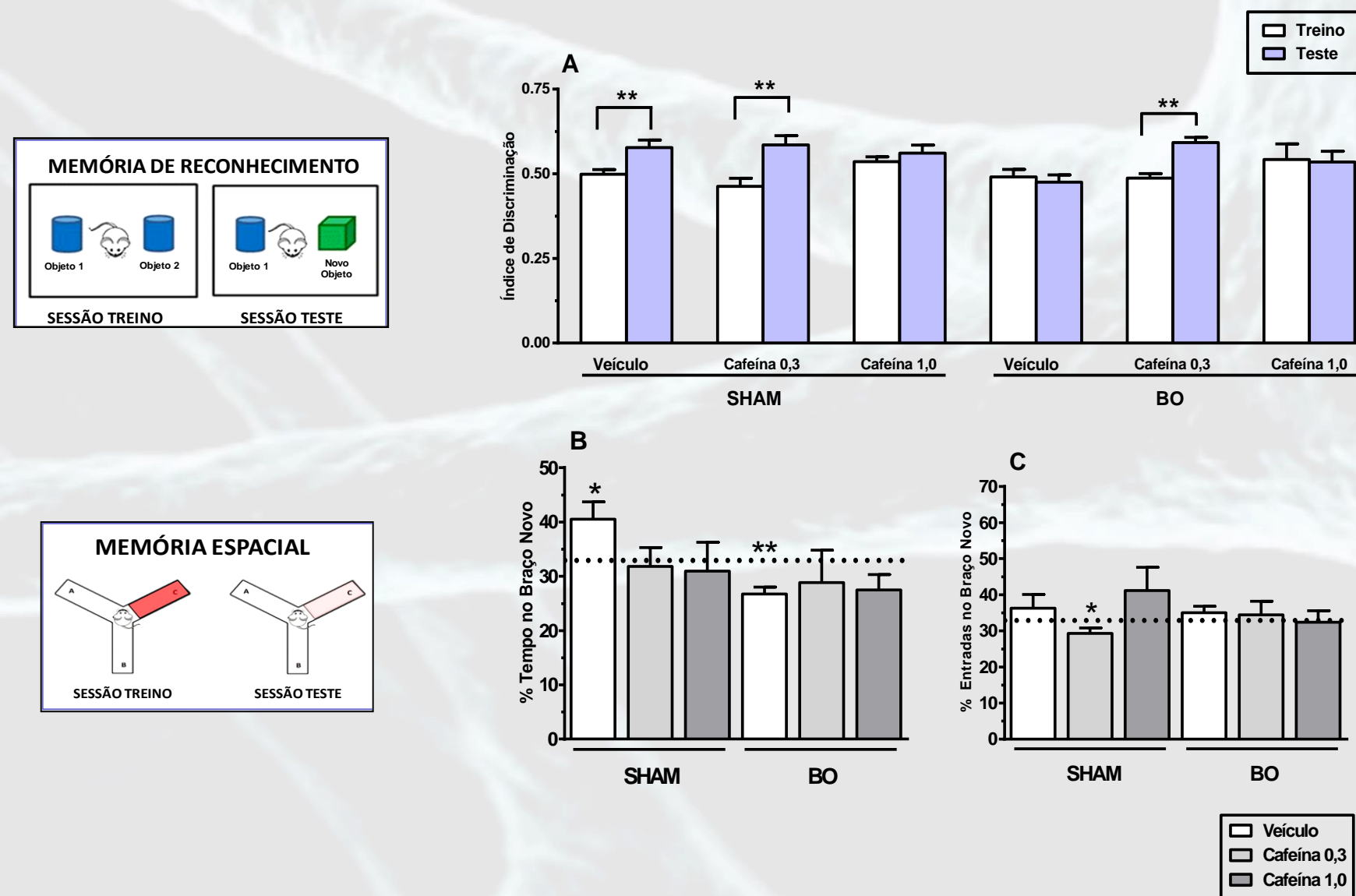


## Resultados

### TESTES COMPORTAMENTAIS



**Figura 1.** Efeitos do tratamento crônico (7 semanas) com cafeína (0,3 ou 1,0 g/L) sobre a atividade locomotora (Figura 1A) e sobre o comportamento anedônico (Figuras 1B e 1C) de camundongos bulsectomizados no Teste de Campo Aberto (TCA) e no *Splash Test*, respectivamente. Os animais receberam o tratamento com cafeína em duas doses (0,3 e 1 g/L) na água de beber durante a noite, o que corresponde ao ciclo ativo dos animais, a fim de mimetizar o padrão de consumo de cafeína em humanos. Durante o ciclo claro, os camundongos CF1 receberam água *ad libitum*. A Figura 1A representa a distância percorrida dos animais quando submetidos ao TCA, a Figura 1B representam a latência para os animais exibirem o comportamento de auto-limpeza e a Figura 1C o tempo total de auto-limpeza durante o *Splash Test*. Cada coluna representa a média ± EPM (N = 7-11/grupo experimental). \* P<0,05 quando comparado com o grupo controle (SHAM-Veículo), \*\* P<0,01 quando comparado ao grupo BO-Veículo. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Duncan.

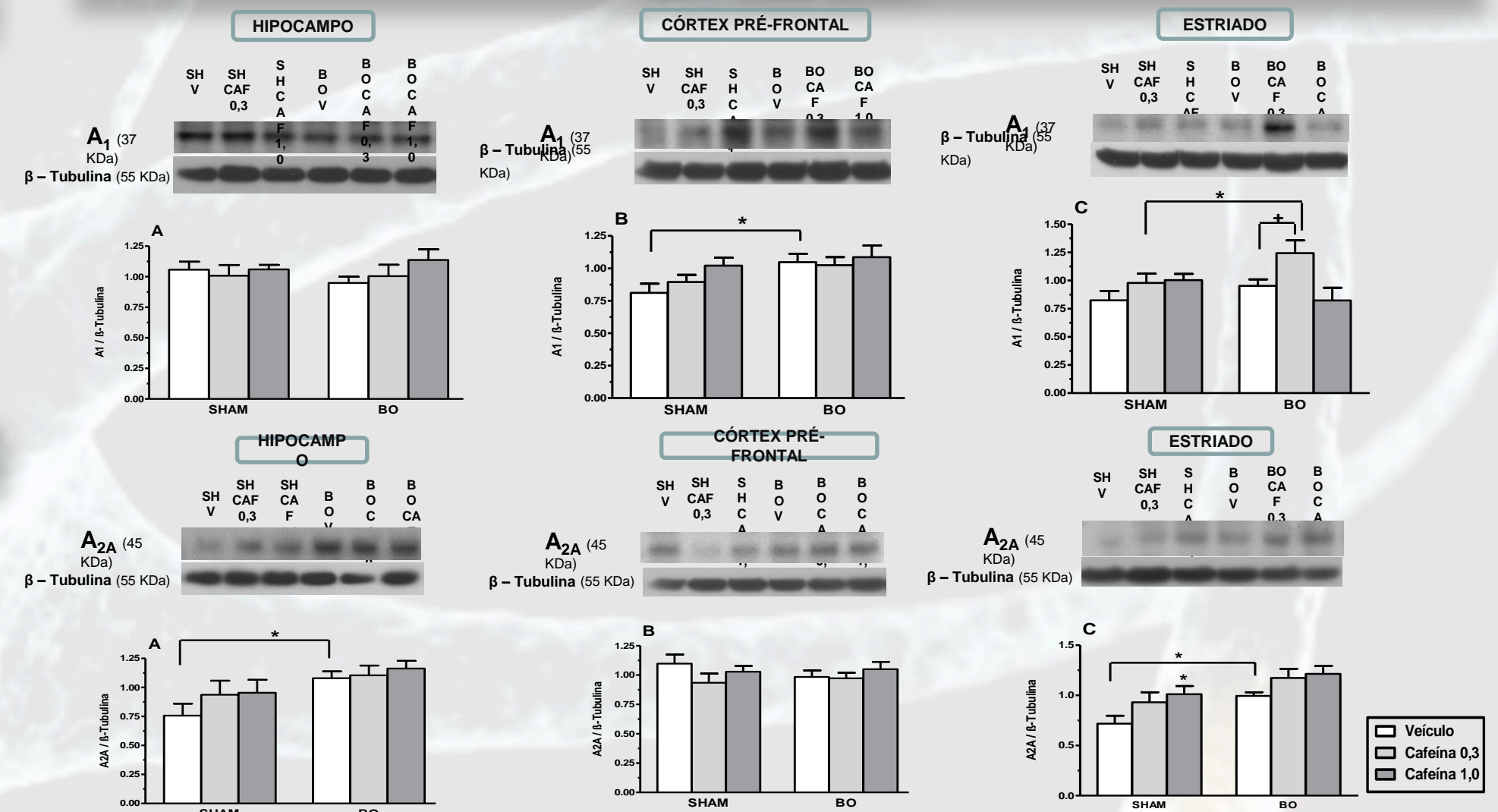


**Figura 2.** Efeitos do tratamento crônico (7 semanas) com cafeína (0,3 ou 1,0 g/L) em camundongos bulsectomizados, sobre o desempenho na Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO) e sobre o desempenho na Tarefa do Y Maze. A Figura 2A mostra o índice de discriminação de objetos na sessão treino (barras brancas) e na sessão teste (barras lilás). A sessão teste foi realizada 90 minutos depois da sessão de treino e a análise estatística realizada foi pelo teste *t* (não pareado). A Figura 2B representa o percentual de tempo de exploração no braço novo do aparato, e a Figura 2C representa o percentual do número de entradas no braço novo. A sessão teste na tarefa do Y Maze, foi realizada 30 minutos depois da sessão treino. Cada coluna representa a média ± EPM (N = 7-11/grupo experimental). No TRO, \*\* P<0,01, indica a diferença no índice de discriminação entre as sessões treino e teste de cada grupo. E no Y Maze, \* P<0,05 e \*\* P<0,01, quando comparado com a exploração aleatória dos braços de 33%, caracterizada pela probabilidade de cada animal explorar cada braço do aparato do Y Maze durante a sessão de teste. Os resultados foram analisados por análise de teste *t* não pareado (Figura 2A) e teste *t* utilizando como valor hipotético de 33 (Figura 2B).

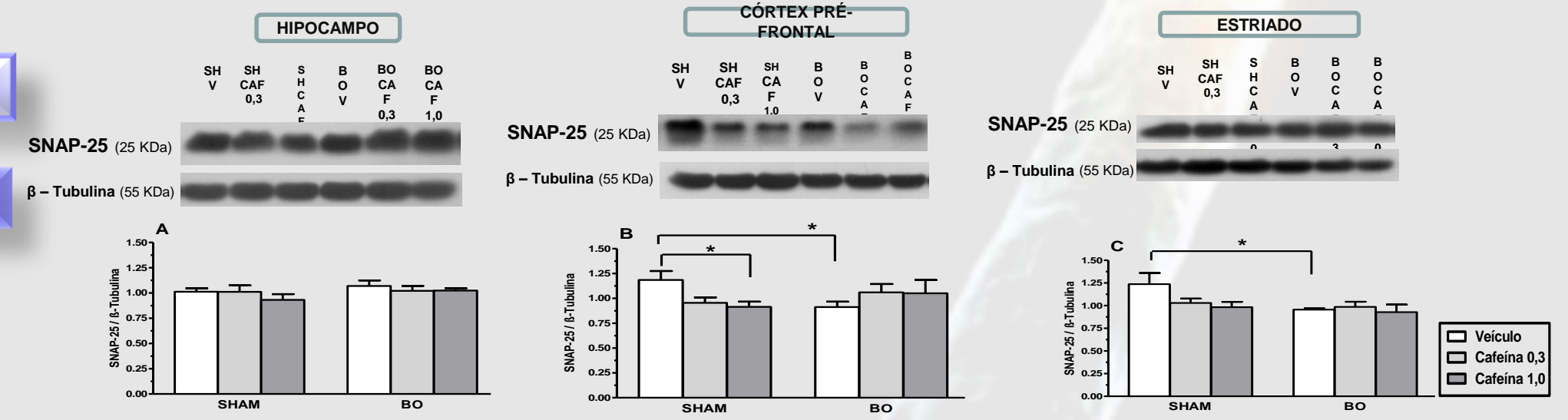
## Conclusão

A cafeína preveniu o comportamento tipo-depressivo induzido pela BO. Porém, esses efeitos preventivos não foram associados às alterações neuroquímicas apresentadas pelos animais bulsectomizados. Por outro lado, a cafeína *per se* foi capaz de alterar SNAP-25 e os receptores A<sub>2A</sub>. Ainda precisa ser determinado se a cafeína poderia prevenir a neurodegeneração causada pela BO pelos seus efeitos *per se*. De qualquer maneira, os dados comportamentais reforçam as evidências epidemiológicas da cafeína como uma promissora ferramenta terapêutica na profilaxia e/ou tratamento da depressão.

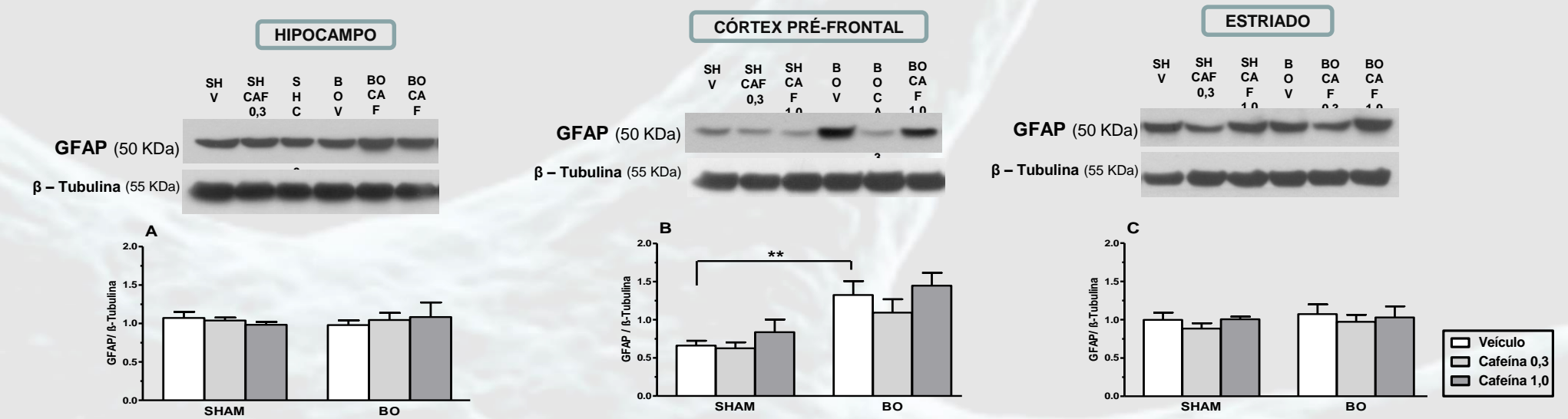
## WESTERN BLOT



**Figura 3.** Imunoconteúdo de receptores de adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> em camundongos bulsectomizados e submetidos ao tratamento crônico com cafeína (0,3 e 1 g/L) na água de beber por 7 semanas. A quantificação dos receptores de adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> no hipocampo estão representados na Figura 3A, no córtex pré-frontal (Figura 3B) e no estriado (Figura 3C) dos camundongos bulsectomizados e tratados com cafeína. Cada coluna representa a média ± EPM (n = 6-9 animais por grupo experimental). As densidades foram mensuradas por Western blot e normalizadas pela densidade de β-tubulina. Na parte superior das figuras estão as bandas representativas de Western blot para os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> e β-tubulina. \*P<0,05, indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle (SHAM-Veículo), \*\*P<0,01, indica diferença significativa quando comparado com o grupo BO-Veículo. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Duncan. Os grupos são: SH-V (SHAM-Veículo), SH-CAF 0,3 (SHAM-Cafeína 0,3), SH-CAF 1,0 (SHAM-Cafeína 1,0), BO-V (BO-Veículo), BO-CAF 0,3 (BO-Cafeína 0,3), BO-CAF 1,0 (BO-Cafeína 1,0).

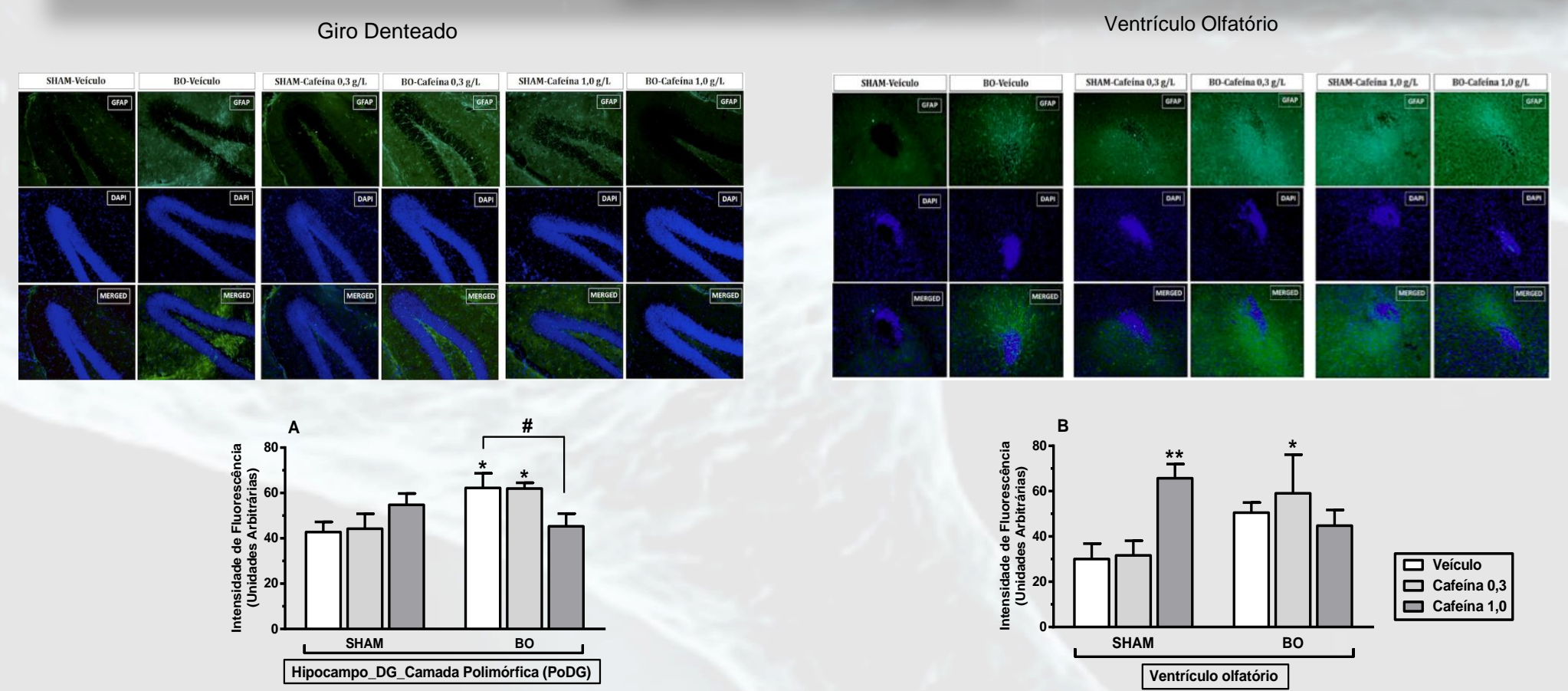


**Figura 4.** Imunoconteúdo de SNAP-25 (proteína associada ao sinaptossoma de 25 kDa) em camundongos bulsectomizados e submetidos ao tratamento crônico com cafeína (0,3 e 1 g/L) na água de beber por 7 semanas. A quantificação de SNAP-25 no hipocampo estão representados na Figura 4A, no córtex pré-frontal (Figura 4B) e no estriado (Figura 4C) dos camundongos bulsectomizados e tratados com cafeína. Cada coluna representa a média ± EPM (n = 6-12 animais por grupo experimental). As densidades foram mensuradas por Western blot e normalizadas pela densidade de β-tubulina. Na parte superior das figuras estão as bandas representativas de Western blot para SNAP-25 e β-tubulina. \*P<0,05, indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle (SHAM-Veículo). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Duncan. Os grupos são: SH-V (SHAM-Veículo), SH-CAF 0,3 (SHAM-Cafeína 0,3), SH-CAF 1,0 (SHAM-Cafeína 1,0), BO-V (BO-Veículo), BO-CAF 0,3 (BO-Cafeína 0,3), BO-CAF 1,0 (BO-Cafeína 1,0).

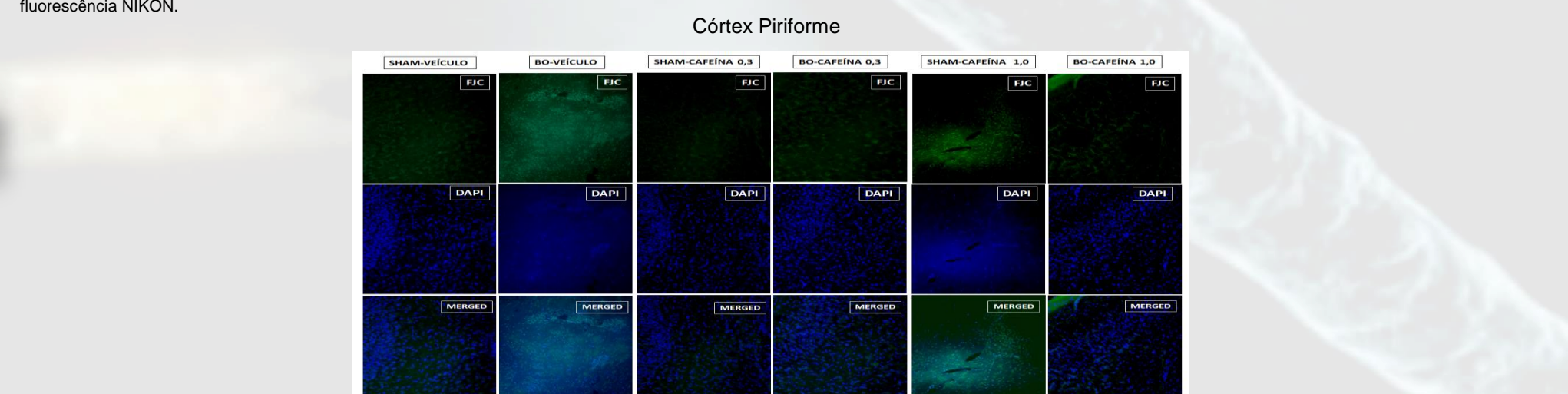


**Figura 5.** Imunoconteúdo de GFAP (proteína ácida fibrilar glial) em camundongos bulsectomizados e submetidos ao tratamento crônico com cafeína (0,3 e 1 g/L) na água de beber por 7 semanas. A quantificação de GFAP no hipocampo estão representados na Figura 5A, no córtex pré-frontal (Figura 5B) e no estriado (Figura 5C) dos camundongos bulsectomizados e tratados com cafeína. Cada coluna representa a média ± EPM (n = 6-12 animais por grupo experimental). As densidades foram mensuradas por Western blot e normalizadas pela densidade de β-tubulina. Na parte superior das figuras estão as bandas representativas de Western blot para GFAP e β-tubulina. \*P<0,01, indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle (SHAM-Veículo). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Duncan. Os grupos são: SH-V (SHAM-Veículo), SH-CAF 0,3 (SHAM-Cafeína 0,3), SH-CAF 1,0 (SHAM-Cafeína 1,0), BO-V (BO-Veículo), BO-CAF 0,3 (BO-Cafeína 0,3), BO-CAF 1,0 (BO-Cafeína 1,0).

## IMUNOHISTOQUÍMICA



**Figura 6.** Imunoreatividade para GFAP na região da camada polimórfica do giro dentado (PoDG) do hipocampo (Figura 6A) e ventrículo olfatório (Figura 6B) de camundongos bulsectomizados e submetidos ao tratamento crônico com cafeína (0,3 e 1,0 g/L) na água de beber, e seus respectivos grupos controles (SHAM-veículo e SHAMs tratamento com cafeína 0,3 e 1,0 g/L). Cada coluna representa a média ± EPM (n = 4-9 animais por grupo experimental). \*P<0,05, \*\*P<0,01, indica diferença significativa quando comparado com o grupo controle (SHAM-Veículo) e \*p<0,05, quando comparado com o grupo BO-Veículo. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Duncan. Acima estão ilustradas as imagens representativas da região PoDG do hipocampo e ventrículo olfatório de camundongos para a imunoreatividade para GFAP (marcação em verde) e DAPI (marcação em azul). Captura das imagens em objetiva de 20X, através de microscópio de fluorescência NIKON.



**Figura 7.** Avaliação da neurodegeneração pela coloração por Fluoro-Jade C no córtex Piriforme de camundongos bulsectomizados e submetidos ao tratamento crônico com cafeína (0,3 e 1,0 g/L) na água de beber, e seus respectivos grupos controles (SHAM-veículo e SHAMs tratamento com cafeína 0,3 e 1,0 g/L). Acima estão ilustradas as imagens representativas de camundongos para a coloração por Fluoro-Jade C (marcação em verde) e DAPI (marcação em azul). Células Fluoro-Jade C positivas foram encontradas no grupo BO-VEÍCULO (dano severo) e SHAM-CAFEÍNA-1,0 (dano leve). Captura das imagens em objetiva de 20X, através de microscópio de fluorescência NIKON.