



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Mayara Arouck Barros

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA CAFEÍNA  
EM RATAS INTOXICADAS POR ETANOL NO PADRÃO  
*BINGE***

BELÉM – PA

2019

MAYARA AROUCK BARROS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA CAFEÍNA  
EM RATAS INTOXICADAS POR ETANOL NO PADRÃO  
*BINGE***

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luanna de Melo Pereira Fernandes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos, com ênfase em neurocomportamento, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PA  
2019

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Mayara Arouck Barros

### **AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA CAFEÍNA EM RATAS INTOXICADAS POR ETANOL NO PADRÃO *BINGE***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos, com ênfase em neurocomportamento, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Banca examinadora:

\_\_\_\_\_  
Profª Drª Cristiane do Socorro Ferraz Maia - Orientadora

\_\_\_\_\_  
Profª Drª Luanna de Melo Pereira Fernandes - Co-orientadora

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado - Banca 1

\_\_\_\_\_  
Profª Drª Barbarella de Matos Macchi - Banca 2

## DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a Deus e aos meus pais José Raimundo e Simone, que são minha fonte inesgotável de amor.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, meu Pai Celestial e minha força em todos os momentos. À Ele, toda honra e toda glória!

Aos meus pais José Raimundo e Simone, por me apoiarem, me amarem e acompanharem em todos os momentos. A vocês, meu amor incondicional!

À minha irmã Mayra, eterna companheira em todos os momentos da minha vida. Juntas alcançaremos voos mais altos! Sempre juntas!

Ao meu irmão João Victor, por me arrancar sorrisos mesmos nos dias difíceis. Amo você, meu eterno bebê!

Ao meu noivo Carlos Eduardo Machado, por me apoiar, incentivar meu crescimento e tornar a caminhada mais feliz. Amo você, meu amor!

À minha amiga de graduação, pós-graduação e para a vida inteira Taiana Carvalheiro, por toda parceria e força que compartilhamos nos bons e maus momentos durante esta caminhada.

À Prof<sup>a</sup> Dra Cristiane Maia, pela orientação desse trabalho e tantos ensinamentos ao longo destes anos 7 anos de convivência.

À co-orientadora Dra Luanna Fernandes, por todos os ensinamentos a mim repassados com tanta paciência e sabedoria.

Ao meu colega Bruno Gonçalves, pelos conselhos e ensinamentos. Desejo ainda mais sucesso em sua jornada.

Aos alunos de iniciação científica Chirlene Nascimento e Pablo Franco por toda ajuda prestada ao projeto, sempre de forma tão solícita e respeitosa. Desejo um futuro brilhante a vocês!

Aos parceiros de trabalho do LAFICO, por toda ajuda e companheirismo em todos nossos projetos. A companhia de vocês tornou a caminhada mais leve!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade de realização deste estudo.

À Universidade Federal do Pará, pela oportunidade de conclusão de mais uma etapa tão importante em minha vida.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

## EPÍGRAFE

*“Assim diz o Senhor: pois eu bem sei os  
planos que estou projetando para vós;  
planos de paz, e não de mal, para vos dar  
um futuro e uma esperança.”  
(Jeremias 29:11)*

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA CAFEÍNA EM RATAS INTOXICADAS POR ETANOL NO PADRÃO *BINGE*

O álcool etílico é uma substância consumida desde os primórdios da humanidade, se estendendo até os dias atuais. Nesse contexto, os adolescentes estão atraindo a atenção pelo fato do consumo neste grupo estar em constante elevação, principalmente na forma de *Binge Drinking*. Esse modelo de consumo acarreta em prejuízos funcionais, tais como sintomas associados a ansiedade e depressão. Por esse motivo, tem-se buscado compostos bioativos para prevenir tais danos causados, dentre elas podemos destacar a cafeína, substância amplamente consumida no mundo. Diante disto, este trabalho se propôs a investigar o efeito neuroprotetor da cafeína em “*self administration*” sobre os danos provocadas pela intoxicação por Etanol (EtOH) no padrão *binge*, visando uma alternativa para minimizar os danos neurotóxicos promovidos pelo álcool com o simples hábito de tomar café. Para isso, foram utilizados ratos Wistar, fêmeas, idade 35 dias (n=40). No tratamento, os animais receberam repetidamente, cafeína a partir do 35º até 72º dia pós-natal (DPN). A cafeína foi administrada na forma de solução cafeinada na dose de 0,3g/L em “*self-administration*” no período ativo, iniciando 14 dias antes do primeiro dia da intoxicação com EtOH e persistindo durante as 4 semanas de BD. Para a intoxicação por EtOH no padrão *binge*, foi administrada por gavagem na dose de 3 g/kg/dia (20 p/v) durante três dias consecutivos semanalmente nos animais do 49º ao 72º DPN. Para os testes comportamentais, os animais foram expostos aos ensaios de Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Splash e Nado Forçado. Em relação ao comportamento tipo ansioso, o Grupo Cafeína + EtOH apresentou aumento significativo na distância e tempo percorrido na área central no Teste do Campo Aberto quando comparado ao grupo EtOH. No Teste do LCE, o grupo EtOH mostrou redução na %EBA e %TBA quando comparado ao grupo controle. Porém o grupo cafeína mostrou reversão ao aumentar ambos os parâmetros quando comparado ao grupo EtOH. No comportamento tipo depressivo, o grupo EtOH-intoxicado apresentou redução do tempo de lambida e aumento do tempo de imobilidade, nos testes Splash e Nado Forçado, respectivamente. O grupo EtOH + Cafeína conseguiu aumentar o tempo de lambida no primeiro teste e reduzir o tempo de imobilidade no segundo. Desta forma, podemos concluir que o consumo crônico de cafeína, promoveu neuroproteção ao reverter os sintomas semelhantes a ansiedade e depressão.

**Palavras chave:** *binge drinking*; cafeína; emocionalidade; etanol; neuroproteção.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF CAFFEINE IN ETHANOL INTOXICATED RATS IN THE BINGE PATTERN

Ethyl alcohol is a substance consumed since the dawn of mankind, extending to the present day. In this context, adolescents are attracting attention because consumption in this group is constantly rising, especially in the Binge Drinking pattern. This model of consumption leads to functional impairments, such as symptoms associated with anxiety and depression. For this reason, has been sought bioactive compound to prevent such damages, among them we can highlight the caffeine, substance widely consumed in the world. In view of this, this paper aims to investigate the neuroprotective effect of caffeine in self administration on the damages caused by EtOH intoxication in the binge pattern, aiming at an alternative to minimize the neurotoxic damages promoted by alcohol with the simple habit of drinking coffee. For this, Wistar rats, females, age 35 days (n = 40) were used. At treatment, animals received caffeine repeatedly from the 35th to the 72nd postnatal day (PND). Caffeine was administered as a 0.3g / L caffeinated solution in self-administration in the active period, starting 14 days before the first day of ethanol intoxication and persisting during the 4 weeks of BD. For ethanol intoxication in the binge pattern, it was administered by gavage at a dose of 3 g / kg / day (20 w / v) for three consecutive days weekly in the animals from the 49th to the 72nd PND. For behavioral tests, the animals were exposed to Open Field, Elevated-plus-maze, Splash and Forced swimming test. In relation to the anxious type behavior, the Caffeine + EtOH Group showed a significant increase in the distance and time traveled in the central area in the Open Field Test when compared to the EtOH group. In the LCE Test, the EtOH group showed reduction in %EBA and %TBA when compared to the control group. However, the caffeine group showed reversion when increasing both parameters when compared to the EtOH group. In the depressive-type behavior, the EtOH-intoxicated group presented reduction of the grooming time and increased immobility time, in the Splash and Forced Swim tests, respectively. The EtOH + Caffeine group was able to increase grooming time in the first test and reduce immobility time in the second. Thus, we can conclude that chronic consumption of caffeine promoted neuroprotection by reversing symptoms similar to anxiety and depression

**Key words:** binge drinking; caffeine; ethanol; emotionality; neuroprotection.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Perfis comparativos das cidades e os respectivos resultados do teste de compra de bebidas alcóolicas por adolescentes em Paulínia e Diadema, São Paulo (Fonte: Adaptado de Romano et al., 2007). ..... 17
- Figura 2:** Metabolismo do Álcool. (Fonte: Adaptado por Centro de Informações sobre Saúde e Álcool - CISA, 2016). ..... 18
- Figura 3:** Formação da adenosina através do metabolismo oxidativo do EtOH (Fonte: Adaptado de Correa e Font, 2008). ..... 19
- Figura 4:** Hipótese monoaminérgica da depressão (Fonte: Adaptado de Chávez-Castillo et al., 2019). ..... 21
- Figura 5:** Estrutura química da cafeína (Fonte: ACD/Labs, 2013). ..... 22
- Figura 6:** Metabólitos resultantes da desmetilação da Cafeína (Adaptado de Heckman, Weil, & Mejia, 2010) ..... 24
- Figura 7:** Efeitos da cafeína em diferentes alvos bioquímicos em relação à concentração (Fredholm et al., 1999. Adaptado por Teixeira, 2015). ..... 25
- Figura 8:** Esquema de tratamento com Cafeína e Intoxicação por EtOH. .... 33
- Figura 9:** Delineamento experimental do estudo. Após 37 dias de tratamento com cafeína e intoxicação por EtOH, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, sequencialmente: Teste do Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Splash e por fim o Teste do Nado Forçado. .... 37
- Figura 10:** Efeitos da exposição crônica ao EtOH e pré-tratamento com Cafeína em ratas da adolescência à fase adulta no A: Tempo percorrido na área central no Teste do Campo Aberto; B: Distância percorrida na área central. Os erros estão expressos como a média  $\pm$  e.e.p.m do tempo e distância percorrida na área central no tempo máximo de 5 minutos, com 10 animais por grupo. Teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. \*\*\* Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,001$ ; ); +++ Diferença significativa em relação ao grupo EtOH ( $p < 0,001$ ); ## Diferença significativa em relação ao grupo EtOH + Cafeína ( $p < 0,01$ ). ..... 39
- Figura 11:** Efeitos da exposição crônica ao EtOH e pré-tratamento com Cafeína em ratas da adolescência à fase adulta no A: %EBA; B: %TBA no Teste do LCE. Os erros estão expressos como a média  $\pm$  e.e.p.m da %EBA e %TBA no tempo máximo de 5 minutos, com 10 animais por grupo. Teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. \*\*\* Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,001$ ; ); +++ Diferença significativa em relação ao grupo EtOH ( $p < 0,001$ ); ++ Diferença

significativa em relação ao grupo EtOH ( $p < 0,01$ ); ## Diferença significativa em relação ao grupo EtOH + Cafeína ( $p < 0,01$ ). ..... 40

**Figura 12:** Efeitos da exposição crônica ao EtOH e pré-tratamento com Cafeína em ratas da adolescência à fase adulta no Tempo de Auto-limpeza do teste Splash. Os erros estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do tempo de auto-limpeza máximo de 5 minutos, com 10 animais por grupo. Teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. \* Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ); \*\* Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,01$ ); \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo EtOH ( $p < 0,01$ ). ..... 41

**Figura 13:** Efeitos da exposição crônica ao EtOH e pré-tratamento com Cafeína em ratas da adolescência à fase adulta no Tempo de Imobilidade do teste Nado Forçado. Os erros estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do tempo de imobilidade no tempo máximo de 5 minutos, com 10 animais por grupo. Teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. \* Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ); \*\* Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,01$ ); \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo EtOH ( $p < 0,001$ ). ..... 42

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Grupos experimentais. ....	32
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACD</b>	<i>Advanced Chemistry Development</i>
<b>ADH</b>	Álcool Desidrogenase
<b>ALDH</b>	Aldeído Desidrogenase
<b>AMP<sub>c</sub></b>	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>BD</b>	<i>Binge Drinking</i>
<b>CEPAE</b>	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação
<b>CISA</b>	Centro de Informações sobre Saúde e Álcool
<b>COLS</b>	Colaboradores
<b>CRF</b>	Fator Liberador de Corticotropina (do inglês <i>Corticotropin-releasing factor</i> )
<b>CYP2E1</b>	Citocromo P4502E1
<b>DPN</b>	Dia Pós-natal
<b>E.P.M</b>	Erro Padrão da Média
<b>EBA</b>	Entrada no Braço Aberto
<b>EBF</b>	Entrada no Braço Fechado
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Ácido γ-amino-butirico receptor tipo A
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub></b>	Água Destilada
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IEC</b>	Instituto Evandro Chagas
<b>INPAD</b>	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas e outras drogas
<b>LCE</b>	Labirinto em Cruz Elevado
<b>NIAAA</b>	<i>National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism</i>
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>p/v</b>	Porcentagem Peso/Volume
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TBA</b>	Tempo no Braço Aberto
<b>TCA</b>	Teste do Campo Aberto
<b>TOC</b>	Transtorno Obsessivo-Compulsivo

°C

Grau *Celsius*

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 EtOH: considerações gerais .....	16
2.2 Farmacocinética do EtOH .....	18
2.3 Mecanismo neurotóxico do EtOH .....	20
2.4 Cafeína: considerações gerais .....	22
2.5 Farmacocinética e Farmacodinâmica da Cafeína .....	23
2.6 Cafeína e sua ação neuroprotetora .....	26
2. OBJETIVOS .....	29
2.1 Objetivo Geral .....	29
2.2 Objetivos Específicos .....	29
3. METODOLOGIA .....	31
3.1 Animais e Grupos Experimentais .....	31
3.2 Tratamento .....	33
3.3. Ensaios Comportamentais .....	34
3.3.1 Teste do Campo Aberto (TCA) .....	34
3.3.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	34
3.3.3. Teste Splash .....	35
3.3.4. Teste do Nado Forçado .....	36
3.5. Análise Estatística .....	37
4. RESULTADOS .....	39
4.1 Comportamento tipo ansiedade .....	39
4.2. Comportamento tipo anedonia e tipo depressivo .....	41
5. DISCUSSÃO .....	44
6. CONCLUSÃO .....	49
REFERÊNCIAS .....	51
ANEXO A – Parecer do CEPAE .....	60

---

# I INTRODUÇÃO

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 EtOH: considerações gerais

Pelo consumo lícito, legal e de baixo custo, o álcool tornou-se uma das substâncias mais consumidas em nível mundial, além de ser uma das mais antigas JOHNSTON *et al.*, 2014; OMS, 2014). Gigliotti e Bessa (2004) relatam o primeiro registro do uso dessa substância há mais de 6.000 anos, no Egito e Babilônia, ainda fermentada. Com o passar do tempo, na Idade Média, os árabes introduziram uma nova técnica a fim de aumentar o teor alcoólico das bebidas: a destilação (WOUDA *et al.*, 2010). A partir do século XVIII, o consumo de EtOH apresentou crescente crescimento com a maior produção e comercialização de bebidas alcoólicas (GIGLIOTTI e BESSA, 2004), perpetuando até os dias atuais.

Modificações fisiológicas e sociais tornam os adolescentes mais susceptíveis ao consumo de álcool (TAPIA-ROJAS, 2017). Nesse contexto, os adolescentes estão atraindo a atenção pelo fato do consumo neste grupo estar em constante elevação, sendo essa substância uma das primeiras drogas de escolha entre os jovens. Segundo Pilatti e colaboradores (2018), o consumo ocorre principalmente em estudantes universitários, 3 vezes na semana, particularmente quinta-feira, sexta-feira e sábado. O consumo intenso tem se tornado cada vez mais frequente em diversos países, principalmente de forma intermitente (GUERRI e PASCUAL, 2010).

O modelo de ingestão de forma intermitente e episódica, principalmente em estudantes universitários está se tornando uma prática comum. Este modelo, também chamado de BD é caracterizado pelo consumo de EtOH em um curto período de tempo seguido por um período de abstinência (CREGO *et al.*, 2009). De acordo com o Instituto Nacional de Abuso do Álcool e Alcoolismo (NIAAA, 2004), o padrão de consumo está em torno de 5 doses para homens e 4 doses para mulheres dentro de 2 horas seguido por um período de abstinência, alcançando concentrações em torno de 0,08g/dL.

Segundo dados da Administração de Serviços de Saúde Mental e Substâncias de Abuso (2007), o consumo de álcool na adolescência está aumentando substancialmente, alcançando 51,6% entre indivíduos entre 18 e 20 anos de idade. A ingestão de EtOH neste período da vida gera preocupação pelo fato do cérebro de

adolescentes sofrer modificações substanciais pelo fato de ainda estar em processo de maturação nesta fase da vida (TAPIA-ROJAS, 2017; BRIONES e WOODS, 2013). Um estudo de Squeglia (2013) sugere ainda, que as mulheres jovens são mais susceptíveis aos danos quando comparadas aos homens.

O consumo de EtOH em *binge drinking* na adolescência pode estar relacionado a consequências negativas como acidentes automobilísticos, violência sexual, déficits cognitivos, prejuízos escolares e aumento do risco de desenvolver alcoolismo na vida adulta. No Brasil, as leis proíbem a venda de bebida alcóolica para menores de 18 anos, porém em um estudo de Romano *et al* (2007), 83,8% dos adolescentes menores de idade conseguiram comprar bebidas alcóolicas em estabelecimentos de 2 cidades de São Paulo (Figura 1).

Variável	Cidade	
	Paulínia (N=108)	Diadema (N=426)
Idade questionada		
Sim	30,5%	30,5%
Solicitação de documento		
Sim	0%	14,3%
Resultado do teste		
Compra efetuada	85,2%	82,4%

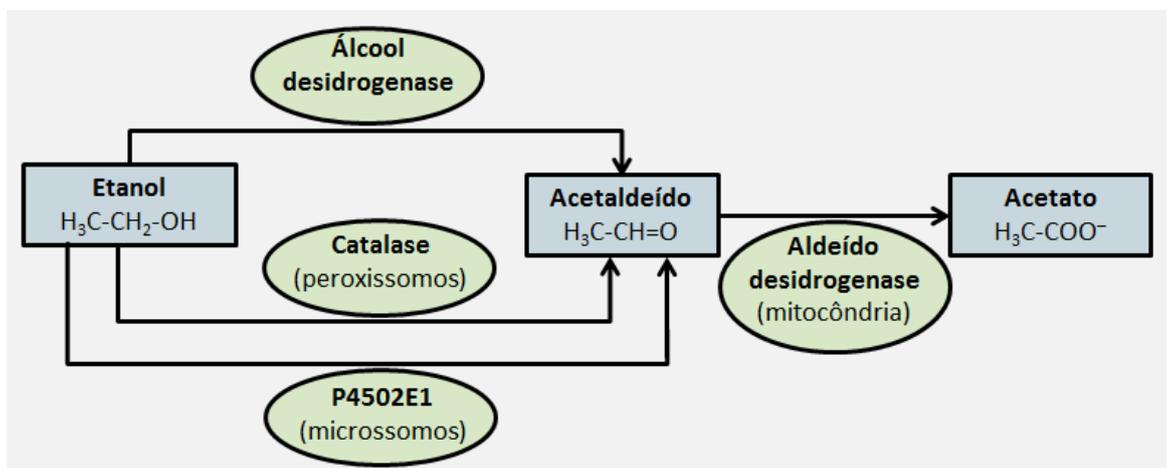
**Figura 1:** Perfis comparativos das cidades e os respectivos resultados do teste de compra de bebidas alcóolicas por adolescentes em Paulínia e Diadema, São Paulo (Fonte: Adaptado de Romano *et al.*, 2007).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009) divulgou um estudo onde mostra que 71,4% dos adolescentes do último ano do ensino fundamental já experimentaram bebida alcóolica, com um índice maior em mulheres (73,1%) do que em homens (69,5%). O estudo revela ainda maior elevação dos índices em adolescentes de escolas privadas do que em escolas públicas (75,7% e 70,3%, respectivamente). Esses dados corroboram com o levantamento do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD, 2013), ao descrever que o gênero feminino revelou o maior aumento (36%) do consumo de EtOH em relação ao ano de 2006, comparado com o gênero

masculino. Sanchez (2011) também contribui ao relatar que estudantes brasileiros de maior nível econômico apresentam maior risco de consumo de EtOH em *binge drinking* pela facilidade de acesso e frequentes idas à festas e bares, considerando o modelo de desenvolvimento social o principal fator associado à essa prática.

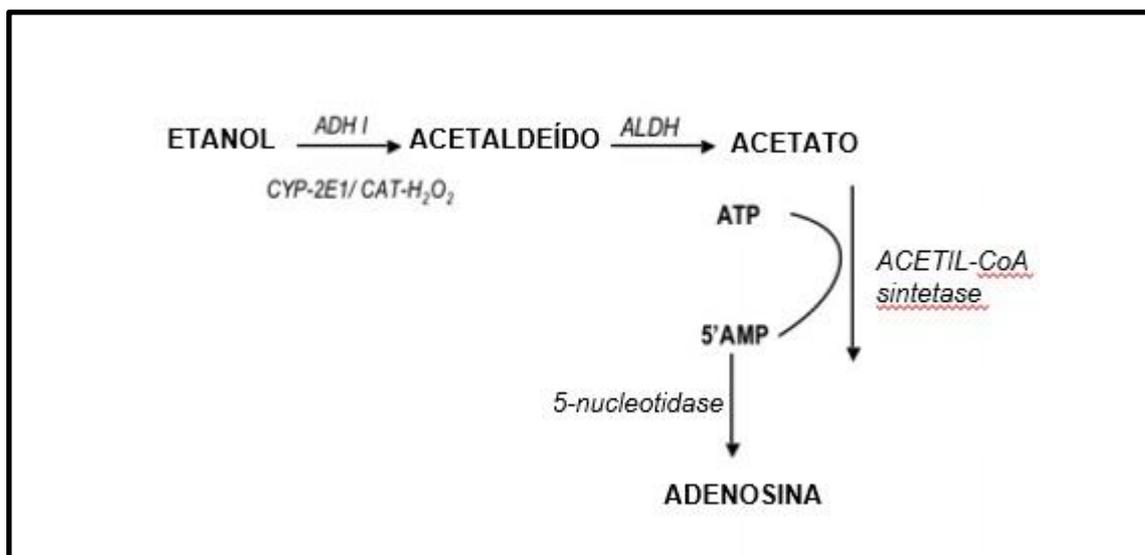
## 2.2 Farmacocinética do EtOH

O EtOH apresenta-se na forma solúvel em água, dessa forma ele atravessa livremente as barreiras e chega a corrente sanguínea para ser distribuído para diversos órgãos, como coração, músculos, fígado e cérebro. A absorção acontece de forma mais rápida pelo intestino e mais lenta pelo estômago (CISA, 2016). O metabolismo principal é hepático (Figura 2), onde a enzima álcool desidrogenase (ADH), presente no citosol, metaboliza o EtOH em acetaldeído e a enzima aldeído desidrogenase (ALDH), por sua vez, converte o acetaldeído em acetato, onde este produto é distribuído na circulação sistêmica. Outras duas vias também contribuem para o metabolismo oxidativo do álcool: Catalase, localizada nos peroxissomos, e Citocromo P450 pela ação da CYP2E1, presente nas células microsossomais (ZAKHARI, 2006). A principal via de excreção é através da oxidação acima citada e em menor proporção pela respiração, urina e suor (90% e 10%, respectivamente) (CEDERBAUM, 2012; SCHUCKIT, 2009).



**Figura 2:** Metabolismo do Álcool. (Fonte: Adaptado por Centro de Informações sobre Saúde e Álcool - CISA, 2016).

O EtOH, durante seu metabolismo oxidativo atua como precursor para elevação dos níveis de adenosina, através do seu produto, acetato. O metabolismo do acetato dá origem a Acetil-CoA através da Acetil-CoA sintetase e adenosina trifosfato (ATP). O ATP, durante a reação, perde 2 moléculas de fosfato e se transforma em 5 adenosina-monofosfato, que por sua vez, através da 5-nucleotidase irá dar origem a maiores níveis de adenosina (Figura 3). Portanto, estudos indicam o papel do EtOH na elevação dos níveis de adenosina, que podem ocorrer através do aumento da liberação de adenosina e redução da captação. (LOPEZ-CRUZ *et al.*, 2013 ; CORREA E FONT, 2008).



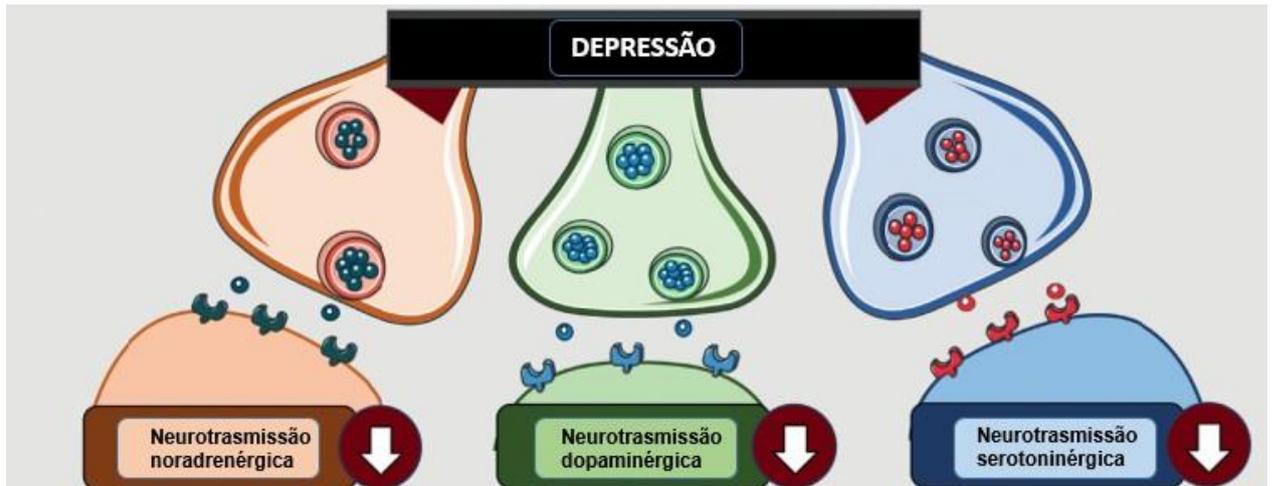
**Figura 3:** Formação da adenosina através do metabolismo oxidativo do EtOH (Fonte: Adaptado de Correa e Font, 2008).

### 2.3 Mecanismo neurotóxico do EtOH

Diversos sistemas de neurotransmissores são afetados pelo EtOH em altas doses, porém os principais são o gabaérgico e glutamatérgico (KUMAR *et al.*, 2013). O EtOH, ao se ligar ao receptor gabaérgico, promove uma facilitação da inibição resultando em maior efeito inibitório, fato observado pelo comportamento relaxante e sedativo após a ingestão da droga (CISA, 2016). A exposição crônica pode resultar em efeitos sedativos, prejuízo na coordenação motora e cognição pelo aumento da sensibilidade de respostas do receptor gabaérgico (SILVERS *et al.*, 2003).

No caso do receptor glutamatérgico, mais especificamente o receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA), o EtOH age bloqueando esse receptor excitatório impactando em prejuízos cognitivos, motor e no comportamento de emocionalidade (MILLER, 2006 e CASILLAS-ESPINOSA *et al.*, 2012). No período de abstinência desta droga, ocorre o processo de regulação negativa (do inglês “*down-regulation*”) da via gabaérgica, caracterizada pelo excesso de glutamato em relação ao sistema gabaérgico com conseqüente comportamento relacionado à ansiedade, insônia e tremores (SCHUCKIT, 2009; VENGELINE *et al.*, 2008).

Considerando a teoria monoaminérgica da depressão, esta doença pode ser explicada pela redução dos níveis de monoaminas: dopamina, serotonina e norepinefrina no SNC (Figura 4). (ESCUDEIRO *et al.*, 2013). Achados deste mesmo grupo sugerem que uma única dose de EtOH via gavagem na dose de 2g/kg resultou em efeito do tipo depressivo em ratos, expresso pelo aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado e teste de suspensão da cauda, além de diminuição dos níveis de noradrenalina e dopamina no córtex pré-frontal. Estudos demonstraram prejuízo na transmissão serotoninérgica com baixo teor cerebral deste neurotransmissor em roedores expostos ao EtOH (WONG *et al.*, 1990; ZHOU *et al.*, 1994). Também há relatos de baixo teor de ácido 5-hidroxiindoleacético, o principal metabólito da serotonina, no líquido cefalorraquidiano em pacientes alcoolistas (FILS-AIME *et al.*, 1996).

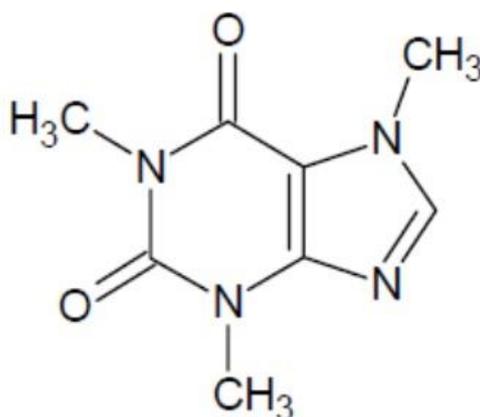


**Figura 4:** Hipótese monoaminérgica da depressão (Fonte: Adaptado de Chávez-Castillo et al., 2019).

Briones e Woods (2014) relataram sintomas semelhantes à depressão com comportamento tipo anedonia em roedores com concentração de álcool no sangue maior que 80mg/dL. Corroborando com este achado, nosso grupo de pesquisa vem demonstrando que 4 episódios de BD na dose de 3g/kg/dia (20%p/v) são suficientes para causarem danos motores, cognitivos e aumento do comportamento semelhante à ansiedade e depressão em roedores fêmeas (BELÉM-FILHO *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2018). Por esse motivo, tem-se buscado compostos bioativos para prevenir tais danos causados pelo consumo intermitente e episódico de EtOH, dentre elas pode-se destacar a cafeína.

## 2.4 Cafeína: considerações gerais

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcaloide pertencente à classe das metilxantinas (Figura 4). Foi descoberta em 1820, no chá de *Camellia sinensis* e no café obtido da espécie *Coffea arábica* (KIHLMAN, 1977). Essa substância está associada a alterações de funções cognitivas, como sensação de alerta, melhora do humor, memória e atividade psicomotora (SMITH, 2002; RIEDEL *et al.*, 1995) e está presente em um elevado número de produtos alimentícios como café, chá, barras de chocolate, refrigerantes e energéticos, sendo considerada a substância ativa mais amplamente consumida no mundo (FREDHOLM *et al.*, 1999; BURDAN, 2015). Segundo Barone e Roberts (1996), o café está entre as bebidas não alcoólicas mais consumidas em nível global. A cafeína está presente diariamente na dieta da população, sua concentração varia de acordo com o tipo de bebida consumida, de acordo com o postulado por Heckman, Weil, & Mejia (2010) em 250 mL de: café instantâneo (133mg), chá (53mg), chá mate (78mg), refrigerantes (23mg) e energéticos (76mg).

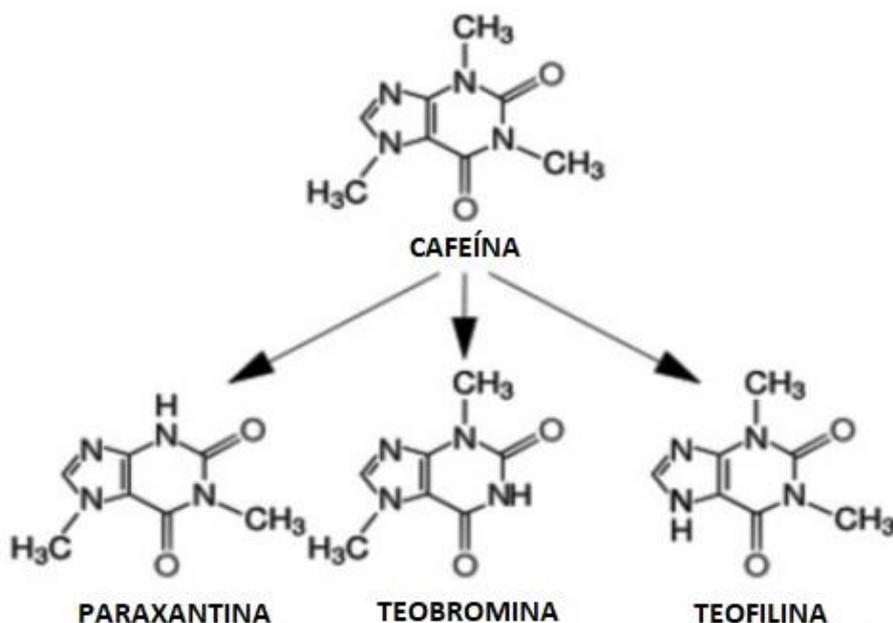


**Figura 5:** Estrutura química da cafeína (Fonte: ACD/Labs, 2013).

## 2.5 Farmacocinética e Farmacodinâmica da Cafeína

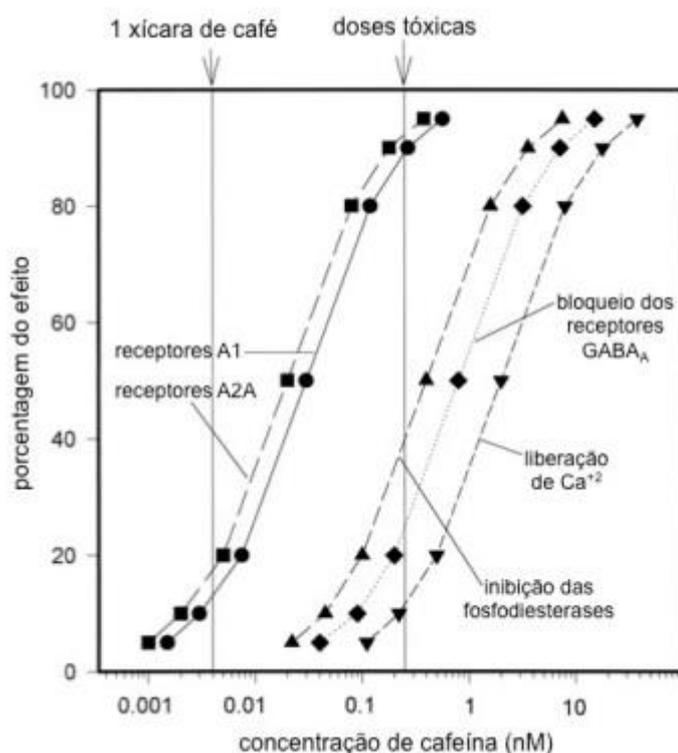
A cafeína apresenta rápida e quase completa (99%) absorção pelo trato gastrointestinal, sendo 20% absorvido pelo estômago e 80% pelo intestino delgado, tanto para humanos quanto para roedores (FREDHOLM *et al.*, 1999; BURDAN, 2015). Por não apresentar efeito significativo de primeira passagem, a absorção independe da via de administração, assim como estado de saúde, idade e sexo (BURDAN, 2015). A sua característica hidrofóbica e baixa ligação às proteínas plasmáticas permite a sua passagem pelas membranas biológicas e corrente sanguínea, respectivamente (FREDHOLM *et al.*, 1999). As concentrações plasmáticas máximas são atingidas entre 15 a 120 minutos após ingestão oral e o tempo de meia vida plasmática varia entre 2,5 a 4,5 horas. Contudo, em roedores, a meia-vida das metilxantinas é mais curta, em torno de 0,7 a 1,2h (FREDHOLM *et al.*, 1999). Fredholm (1999) estipula que, de modo geral, assume-se que em ratos, 10mg/kg representa cerca de 250mg de cafeína (2 a 3 xícaras de café) em humanos de 70kg (3,5mg/kg).

A cafeína é rapidamente distribuída para a maioria dos tecidos e órgãos (BURDAN, 2015), atravessa barreira hematoencefálica e placentária (LORIST E TOPS, 2003). É metabolizada em maior parte no fígado pela enzima Citocromo P450 1A2, que por desmetilação (remoção dos grupos metila 1 e 7), forma 3 metabólitos considerados biologicamente ativos: paraxantina (81,5%), teobromina (10,8%) e teofilina (5,4%) (BURDAN, 2015; SINCLAIR E GEIGER, 2000; Figura 5). Embora a maior parcela da substância apresente metabolismo hepático, o cérebro e rins também desempenham essa função (FERREIRA, 2006). A excreção é principalmente renal, mas também pode ocorrer pela saliva, suor e fezes (BURDAN, 2015).



**Figura 6:** Metabólitos resultantes da desmetilação da Cafeína (Adaptado de Heckman, Weil, & Mejia, 2010).

A ação da cafeína pode ser mediada por diferentes mecanismos: antagonismo dos receptores de adenosina A1 e A2A, inibição das fosfodiesterases, liberação do cálcio intracelular e bloqueio dos receptores GABA<sub>A</sub>, sendo o primeiro o principal nas doses usualmente utilizadas (Figura 6). Este antagonismo adenosinérgico é o mecanismo pelo qual a cafeína promove seus efeitos estimulantes no SNC (FREDHOLM *et al.*, 1999). Os receptores da adenosina são do tipo metabotrópicos e encontrados principalmente no SNC e coração, mais precisamente o receptor A1 se encontra nas regiões cerebrais como córtex e sistema límbico e A2A no núcleo accumbens e estriado, e em menor proporção no córtex, hipocampo, hipotálamo e cerebelo (YAMADA *et al.*, 2014; GAO e JACOBSON, 2011; REBOLA *et al.*, 2003).



**Figura 7:** Efeitos da cafeína em diferentes alvos bioquímicos em relação à concentração (Fredholm et al., 1999. Adaptado por Teixeira, 2015).

Os receptores A1 exercem efeitos inibitórios da atividade da adenilato ciclase, dessa forma resultando em redução do AMPc, ativando os canais de potássio e bloqueando os canais de cálcio, sendo associado ao controle da atividade neuronal pelo bloqueio da liberação de neurotransmissores, tais como dopamina, glutamato, serotonina e acetilcolina (WEI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2013). Ribeiro *et al.* (2003) relatam que efeitos de neuroproteção, regulação do sono e maturação neuronal estão relacionados à ativação destes receptores A1.

Os receptores A2A promovem efeitos excitatórios, elevando os níveis do AMPc. Assim, a adenosina assume múltiplas propriedades no SNC, além de ser responsável pela modulação de outros neurotransmissores. As interações com sistemas neurotransmissores glutamatérgicos e dopaminérgicos fazem da adenosina um neuromodulador capaz de influenciar o funcionamento de sistemas com funções neurológicas vitais. Inibidores desses receptores, como a cafeína, apresentam funções protetoras e previnem a apoptose (BOISON, 2008).

## 2.6 Cafeína e sua ação neuroprotetora

Prediger (2010), Kolahehdouzan e Hamadeh (2017), Madeira *et al.*, (2017) e Gonçalves *et al.*, (2013) sugerem em seus estudos, que a cafeína pode estar associada a neuroproteção contra a degeneração de neurônios, Além de estar associada a prevenção de doenças cognitivas (GELBER *et al.*, 2011). Esta substância, em doses baixas a moderadas produzem efeitos positivos relacionados ao aumento do ânimo, porém, em doses elevadas esses efeitos positivos podem ser revertidos (MIKALSEN *et al.*, 2001). O efeito neuroprotetor dos antagonistas adenosinérgicos são ressaltados por Soliman *et al.*, (2016) ao sugerir que nas doses habitualmente utilizadas, a cafeína reduz a morte de neurônios na substância negra.

Os receptores de adenosina A1 reduzem a liberação de glutamato e hiperpolarizam neurônios, dessa forma, estando positivamente envolvidos na neuroproteção (CUNHA, 2005). Por outro lado, há mais evidências demonstrando que a neuroproteção está mais envolvida com o bloqueio dos receptores de adenosina A2a (HIGGINS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007; CUNHA e AGOSTINHO, 2010). Diversas áreas cerebrais estão associadas à neuroproteção provocada pelo bloqueio deste receptor, como: córtex, hipocampo, estriado e substância negra (PREDIGER, 2010). Um estudo de Laurent e colaboradores (2014) demonstrou que a administração oral de antagonistas A2a provocou proteção na memória, com promoção de plasticidade do hipocampo de camundongos.

Há diversos estudos na literatura sobre as alterações de locomoção, ansiedade e depressão provocadas pela cafeína. Kaster *et al.*, (2015), sugere em seu estudo que o receptor A2a apresenta papel fundamental no controle dos transtornos de humor, confirmando as afirmações de relação inversa entre incidência de depressão e consumo de cafeína (LUCAS *et al.*, 2011; LUCAS *et al.*, 2014). O antagonismo deste receptor também está envolvido no aumento da atividade locomotora em baixas doses e redução em altas doses de cafeína, mostrando um efeito bifásico (YACOUBI *et al.*, 2000 ; NIKODIJEVIC e JACOBSON, 1993). Uma revisão de literatura demonstra que há diversos estudos demonstrando ainda a neuroproteção da cafeína em doenças neurodegenerativas ao reduzir apoptose e neuroinflamação (RIVERA-OLIVER e

DIAS-RIOZ, 2014). Porém este estudo é pioneiro ao investigar a neuroproteção da cafeína através do antagonismo dos receptores de adenosina neste protocolo de BD com EtOH.

Diante disto, este trabalho se propôs a investigar o efeito neuroprotetor da cafeína em consumo voluntário sobre os danos provocadas pela intoxicação por EtOH no padrão *binge* em ratos fêmeas, visando uma alternativa para prevenir os danos neurotóxicos promovidos pelo álcool com o simples hábito de tomar café. Vale ressaltar que pelo fato do álcool ser um problema de saúde pública, este trabalho visa contribuir com os impactos socioeconômicos provocados por essa substância.

---

---

## **II OBJETIVOS**

---

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito neuroprotetor da cafeína em ratas intoxicadas por EtOH no padrão *binge*.

### 2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito neuroprotetor da cafeína em ratas intoxicadas por EtOH em padrão *binge* sobre:

- A locomoção espontânea;
- As alterações de comportamento tipo ansiedade;
- O comportamento do tipo anedonia;
- O comportamento do tipo depressivo.

---

---

## **III METODOLOGIA**

---

---

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Animais e Grupos Experimentais

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE), obedecendo-se aos critérios, de acordo com as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais (COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 2011) e aceito sob parecer CEUA nº 8289260417.

Foram utilizadas ratas *Wistar*, idade 35 dias (n=40), provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC). Estes foram mantidos no biotério de Faculdade de Farmácia, em condições padronizadas de temperatura (22°+ 2°C), exatidão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (luz acesa às 07:00), água e comida *ad libitum*, separadas em caixas, medindo 41x34x17 cm, em grupos de 2 animais para evitar estresse por isolamento.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento, da Faculdade de Farmácia, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará e nas salas onde ocorreram os testes comportamentais foram utilizadas lâmpadas fluorescentes para iluminação (12 lux). Os animais foram levados para as salas de testes para aclimatação e ambientação uma hora antes dos testes. Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram sacrificados com deslocamento tronco-cervical. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

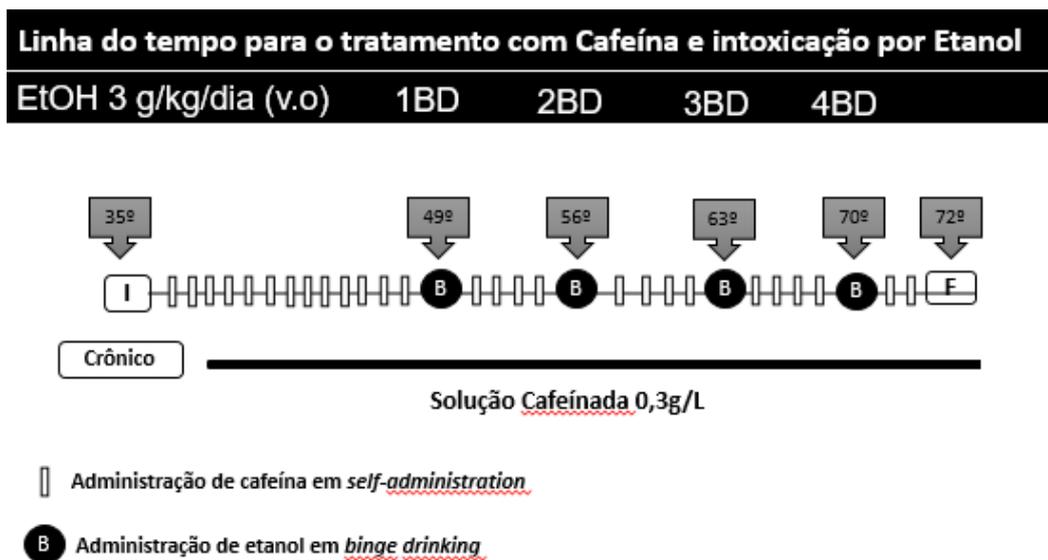
**Quadro 1:** Grupos experimentais.

<b>GRUPO</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>	<b>NÚMERO</b>
<b>CONTROLE/H<sub>2</sub>O</b>	Os animais receberam H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> (em <i>self-administration</i> ) no período ativo por 37 dias e gavagem por 3 dias consecutivos em 4 <i>binges</i> .	10
<b>CAFEÍNA/H<sub>2</sub>O</b>	Os animais receberam solução cafeinada (0,3g/L) (em <i>self-administration</i> ) no período ativo por 37 dias e H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> via gavagem por 3 dias consecutivos em 4 <i>binges</i> .	10
<b>H<sub>2</sub>O/EtOH</b>	Os animais receberam H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> (em <i>self-administration</i> ) no período ativo por 37 dias e EtOH (3g/kg/dia 20% p/v) via gavagem por 3 dias consecutivos em 4 <i>binges</i> .	10
<b>CAFEÍNA/EtOH</b>	Os animais receberam solução cafeinada (0,3g/L) (em <i>self-administration</i> ) no período ativo por 37 dias e EtOH (3g/kg/dia 20% p/v) via gavagem por 3 dias consecutivos em 4 <i>binges</i> .	10

### 3.2 Tratamento

O estudo consistiu na investigação do efeito neuroprotetor da cafeína administrado de forma crônica em ratos fêmeas anteriormente à intoxicação por EtOH em padrão *binge*. Para o tratamento, os animais receberam repetidamente, cafeína a partir do 35º até 72º dia pós-natal (DPN). A cafeína foi administrada em forma de solução cafeïnada (em mamadeiras) na dose de 0,3g/L em “*self-administration*” no período ativo (19:00 as 07:00). Esta forma de ingesta iniciou 14 dias antes do primeiro dia da intoxicação com EtOH e persistiu durante as 4 semanas de BD para preservar seu efeito neuroprotetor a longo prazo (MACHADO *et al.*, 2017; DUARTE *et al.*, 2009).

Para a intoxicação por EtOH no padrão *binge*, foi administrada por gavagem, através de cânula orogástrica (Insight, Brasil) EtOH (Nuclear, Brasil) na dose de 3 g/kg/dia (20 p/v) (LAUING *et al.*, 2008) durante três dias consecutivos semanalmente, do 49º ao 72º DPN, o que corresponde o período de adolescência à fase adulta neste modelo animal (SPEAR, 2000). O grupo controle/H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> recebeu volumes equivalentes de H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>. por administração via gavagem (Figura 7) (Adaptado de Fernandes *et al.*, 2018).



**Figura 8:** Esquema de tratamento com Cafeína e Intoxicação por EtOH.

### **3.3. Ensaio Comportamentais**

#### **3.3.1 Teste do Campo Aberto (TCA)**

Para este teste, com o intuito de avaliar a atividade locomotora bem como comportamento semelhante à ansiedade (DEFRIES et al., 1966), foi utilizada uma arena em acrílico preta (100x100x40cm, INSIGHT, São Paulo, Brasil), divididos virtualmente em 25 quadrantes iguais (20x20cm) separados em duas zonas: uma central (9 quadrantes centrais) e periférica (16 quadrantes periféricos).

Inicialmente, os animais foram colocados individualmente no quadrante central do campo aberto e permitido o livre deslocamento dentro do aparato por 5 minutos. Em seguida, foram mensuradas as variáveis de distância total percorrida (em metros), quadrantes centrais e periféricos cruzados, tempo na área central e periférica, número de autolimpezas (*grooming*) e bolos fecais, conforme protocolos previamente descritos por Walsh e Cummins (1976) e Fernandes et al. (2018). O primeiro parâmetro foi utilizado como medida da atividade locomotora espontânea e os últimos foram relacionados com o estado emocional, indicando um comportamento semelhante à ansiedade (BAHI, 2013; MARRONI *et al.*, 2007).

Após a exposição de cada animal, o aparato foi higienizado com papel toalha e álcool 10%. Após o teste da atividade locomotora, os animais foram submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado.

#### **3.3.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

Este teste é fundamentado na aversão natural de roedores a espaços abertos, sendo um teste simples validado em ratos para medição de ansiedade (PELLOW et al., 1985; TREIT *et al.*, 1993). O LCE é um aparato em forma de cruz, elevado do chão, conta com dois braços opostos fechados por paredes laterais, e dois braços opostos abertos. Neste teste, o animal foi colocado no centro do LCE com a face voltada para um dos braços fechados, sendo permitida a exploração do labirinto por 5

minutos. Apesar do comportamento normal de ratos preferirem locais escuros e fechados à locais iluminados e abertos, os braços do aparato geram comportamento exploratório, dessa forma é possível avaliar o comportamento semelhante à ansiedade ao fato dos animais evitarem os braços abertos (ACEVEDO *et al.*, 2014; KARL *et al.*, 2003; HOGG, 1996).

Foram contabilizados os parâmetros de: número de entradas nos braços abertos (EBA) e fechados (EBF) e o tempo de permanência nos braços abertos (TBA) através do sistema de monitoramento de vídeo ANY-maze® versão 4.99 (STOELTING CO., USA) e posteriormente calculadas as porcentagens através das fórmulas:  $(EBA / (EBA + EBF)) \times 100$  para porcentagem de EBA (%EBA) e  $(TBA / 300) \times 100$  para porcentagem de TBA (%TBA) (BAHI, 2013; PELLOW e FILE, 1986).

Após a exposição de cada animal, o labirinto foi higienizado com papel toalha e álcool 10%. Após o teste, os animais foram submetidos ao teste Splash.

### **3.3.3. Teste Splash**

O teste foi realizado de acordo com o protocolo de Isingrini *et al.* (2010), com modificações (FREITAS *et al.*, 2013) e avalia o comportamento motivacional do animal, associando a autolimpeza como um indício de autocuidado, bem como a redução indica sintomas paralelos à depressão, como a anedonia (WILLNER, 2005).

Para avaliação, esguichou-se solução de sacarose a 10% o dorso do animal, em seguida eles foram, individualmente, colocados em caixas de acrílico (9x7x11cm) e imediatamente iniciou-se a contagem do tempo de autolimpeza por um período de 5 minutos (FREITAS *et al.*, 2013).

Após a exposição de cada animal, o aparato foi higienizado com papel toalha e álcool 10%. Após o teste, os animais foram submetidos ao teste do Nado Forçado.

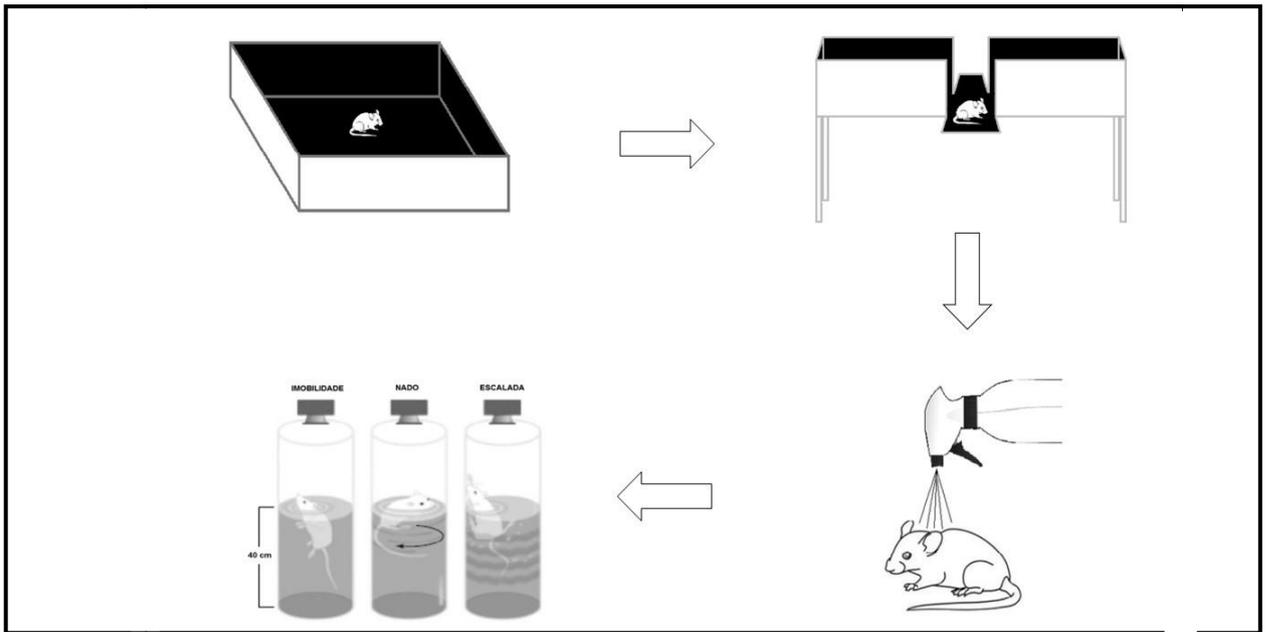
### 3.3.4. Teste do Nado Forçado

Conhecido como modelo de “desespero comportamental”, este teste avalia o comportamento semelhante à depressão através de 3 parâmetros: escalada (do inglês *climbing*), onde o animal apresenta movimento vertical na parede do aparato como tentativa de fuga, nado, representado por movimentos circulatorios no aparato e imobilidade, quando o animal realiza simples movimentos para mantê-lo flutuando. Em animais com comportamento do tipo depressivo, o tempo de imobilidade tende a ser maior (CRYAN et al., 2002; PORSOLT et al., 1977).

O teste do nado forçado foi executado segundo o protocolo proposto por Porsolt et al. (1977). Para isso, animais foram colocados, individualmente, no cilindro de vidro medindo 50 cm de altura com 30 cm de diâmetro e com uma coluna de água de 40 cm. Após 2 minutos de habituação no aparato, foram contabilizados, do 3º ao 5º minuto, os parâmetros de tempo de imobilidade, tempo de nado e números de escaladas.

Após serem retirados do equipamento, os animais foram imediatamente secos com papel toalha e alocados em gaiolas com maravalha seca.

A sequência de ensaios comportamentais foi realizada 19h após a última gavagem de EtOH e está ilustrada na figura abaixo (Figura 9):



**Figura 9:** Delineamento experimental do estudo. Após 37 dias de tratamento com cafeína e intoxicação por EtOH, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, sequencialmente: Teste do Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Splash e por fim o Teste do Nado Forçado.

### 3.5. Análise Estatística

Foi realizado o teste de distribuição gaussiana, normalidade, para cada grupo experimental pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Após a observação da homogeneidade dos dados, utilizou-se ANOVA 2 vias, seguido de teste de Tukey para comparações *post hoc*. Os dados de cada grupo foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.), em que a probabilidade utilizada como existência de diferença significativa foi  $p < 0,05$ .

---

---

## **IV RESULTADOS**

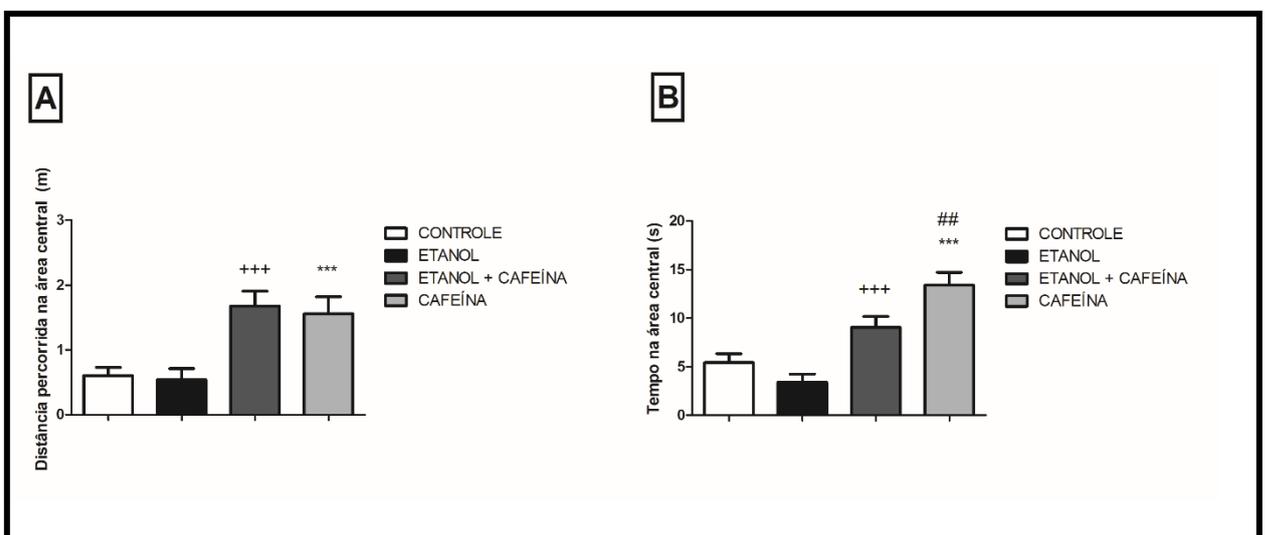
---

---

## 4. RESULTADOS

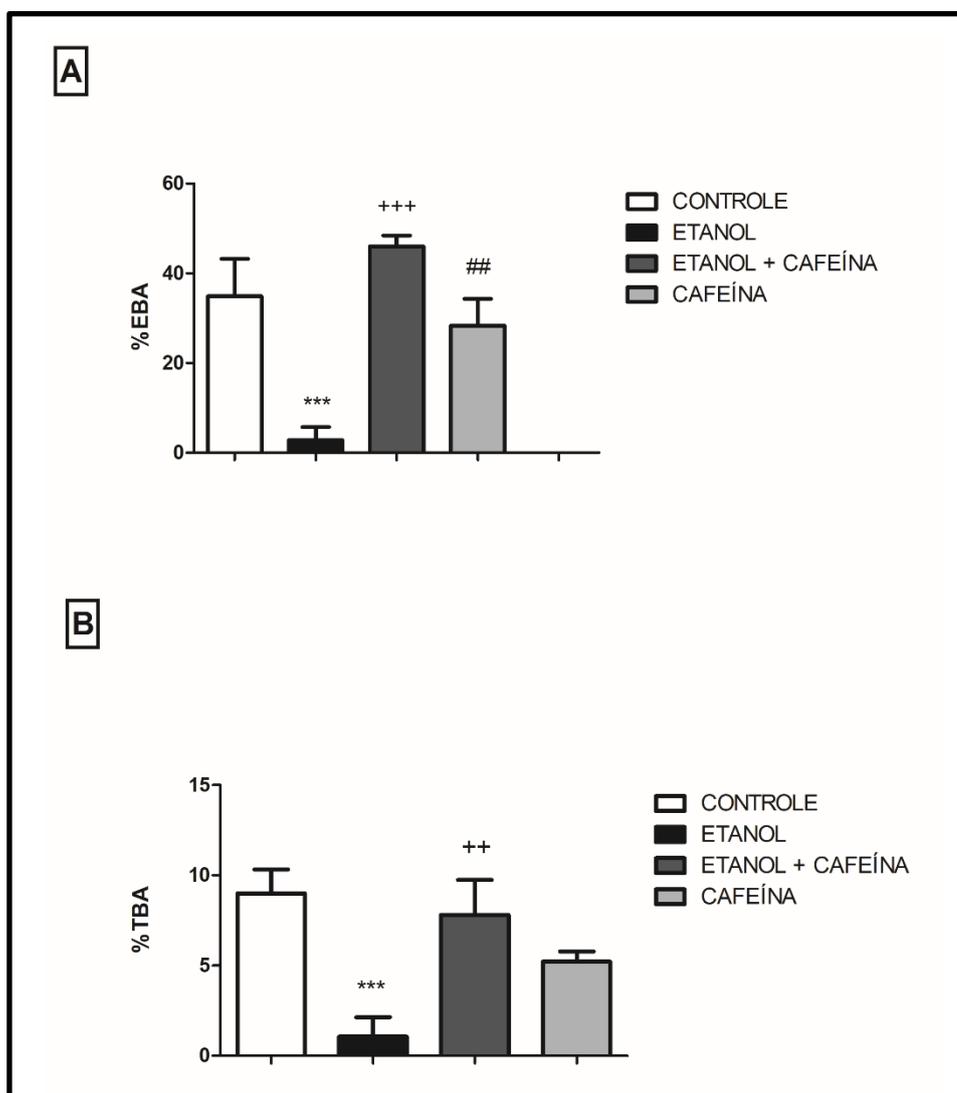
### 4.1 Comportamento tipo ansiedade

A figura 10 ilustra os efeitos da administração de cafeína de forma crônica anteriormente à intoxicação com EtOH no padrão *binge* sobre o comportamento tipo ansiedade nos testes do Campo Aberto. Em relação à distância percorrida na área central (Figura 10A), o grupo Cafeína + EtOH mostrou aumento deste parâmetro quando comparado com o Grupo EtOH ( $p < 0,001$ ). O Grupo Cafeína mostrou aumento do tempo percorrido na área central quando comparado ao Grupo Controle ( $p < 0,001$ ). O parâmetro de tempo percorrido na área central (Figura 10B) também mostrou resultados equivalentes aos da Figura 10A, além do aumento deste parâmetro no Grupo Cafeína comparado ao Grupo Cafeína + EtOH ( $p = 0,007$ ).



**Figura 10:** Efeitos da exposição crônica ao EtOH e pré-tratamento com Cafeína em ratas da adolescência à fase adulta no A: Distância percorrida na área central no Teste do Campo Aberto; B: Tempo percorrido na área central. Os erros estão expressos como a média  $\pm$  e e.p.m do tempo e distância percorrida na área central no tempo máximo de 5 minutos, com 10 animais por grupo. Teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. \*\*\* Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,001$ ; ); +++ Diferença significativa em relação ao grupo EtOH ( $p < 0,001$ ); ### Diferença significativa em relação ao grupo EtOH + Cafeína ( $p < 0,01$ ).

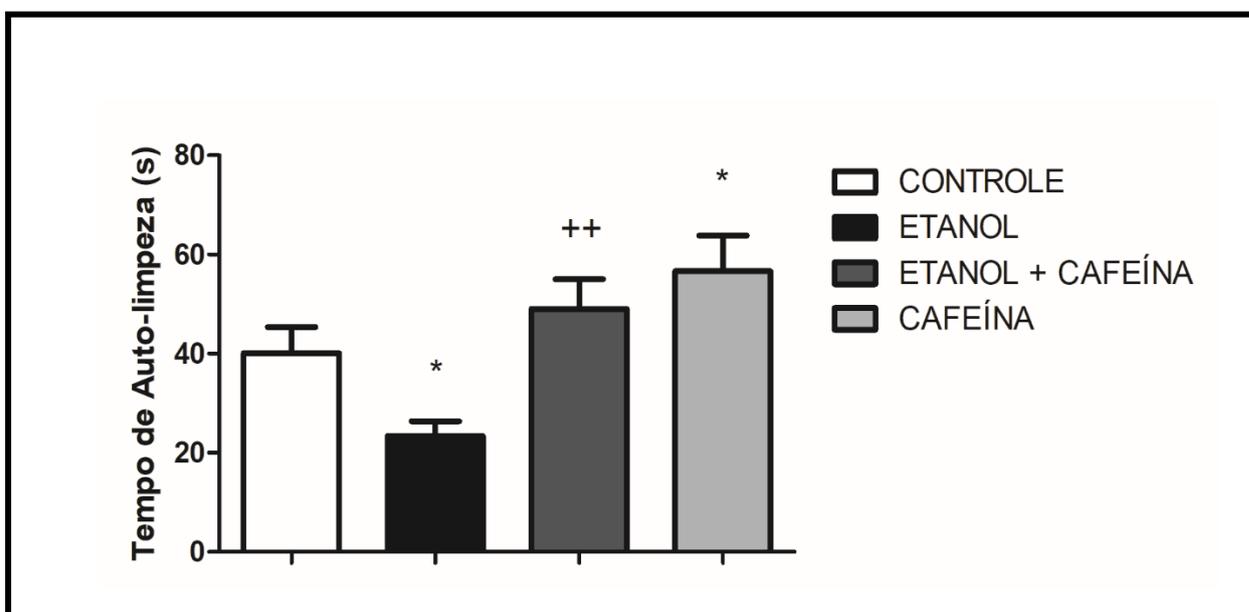
No teste do LCE, o grupo etanol apresentou redução significativa na %EBA (Figura 11A) e %TBA (Figura 11B) em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Porém, nos dois parâmetros o grupo Cafeína + EtOH mostrou capacidade de reversão ao aumentar significativamente a %EBA e %EBA em relação ao grupo EtOH ( $p < 0,001$  e  $p = 0,006$ , respectivamente). Ainda, o grupo cafeína mostrou redução na %EBA quando comparada ao grupo Cafeína + EtOH ( $p = 0,01$ ). Em ambos os parâmetros, o grupo cafeína não mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p = 0,2$  e  $p = 0,3$ , respectivamente).



**Figura 11:** Efeitos da exposição crônica ao EtOH e pré-tratamento com Cafeína em ratos da adolescência à fase adulta no A: %EBA; B: %TBA no Teste do LCE. Os erros estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m da %EBA e %TBA no tempo máximo de 5 minutos, com 10 animais por grupo. Teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. \*\*\* Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,001$ ; ); +++ Diferença significativa em relação ao grupo EtOH ( $p < 0,001$ ); ++ Diferença significativa em relação ao grupo EtOH ( $p < 0,01$ ); ## Diferença significativa em relação ao grupo EtOH + Cafeína ( $p < 0,01$ ).

## 4.2. Comportamento tipo anedonia e tipo depressivo

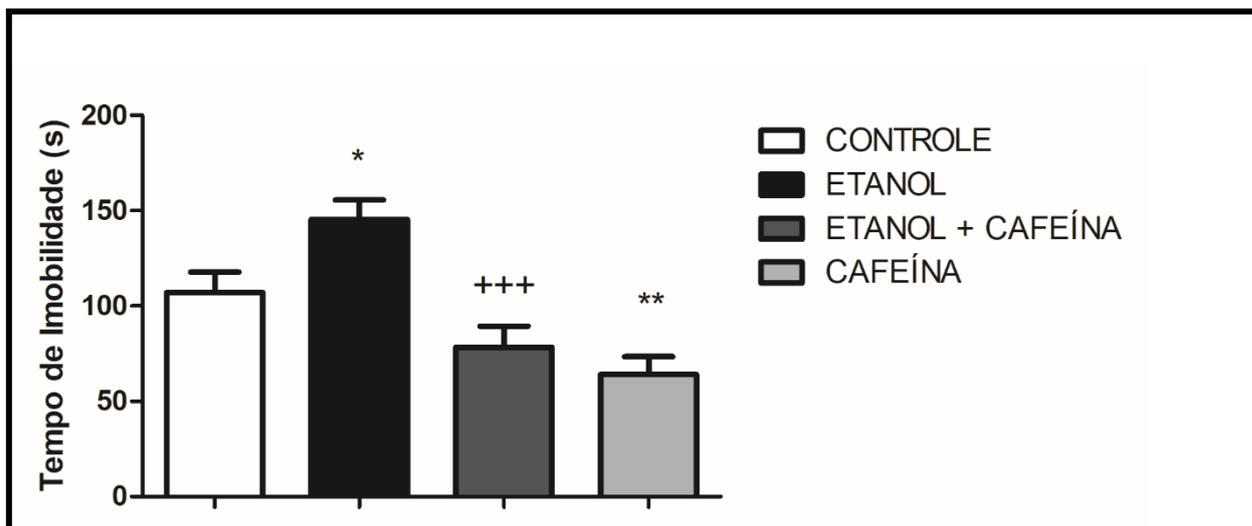
Para avaliação destes dois parâmetros utilizou-se os testes Splash e Nado Forçado. No primeiro (Figura 12), observou-se que o EtOH reduziu o tempo de autolimpeza em relação ao grupo controle ( $p=0,03$ ) porém a associação com Cafeína conseguiu reverter este quadro [Grupo EtOH comparado com Grupo Cafeína + EtOH ( $p=0,003$ )]. Apoiando esta hipótese, é notado que este último grupo não apresentou diferença significativa em relação ao grupo Cafeína ( $p=0,361$ ).



**Figura 12:** Efeitos da exposição crônica ao EtOH e pré-tratamento com Cafeína em ratas da adolescência à fase adulta no Tempo de Auto-limpeza do teste Splash. Os erros estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do tempo de auto-limpeza no tempo máximo de 5 minutos, com 10 animais por grupo. Teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. \* Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) e ++ Diferença significativa em relação ao grupo EtOH ( $p < 0,01$ ).

Em relação ao Teste do Nado Forçado (Figura 13), houve aumento do tempo de imobilidade do Grupo EtOH comparado com o Grupo Controle ( $p=0,01$ ) porém a associação com Cafeína reverteu este quadro [Grupo EtOH comparado com Grupo

Cafeína + EtOH ( $p < 0,001$ )]. Observa-se, ainda, que o Grupo Cafeína mostrou redução neste parâmetro quando comparado ao Grupo Controle ( $p < 0,005$ ). Grupos EtOH + Cafeína e Grupo Cafeína não demonstraram diferença significativa entre si ( $p = 0,344$ ).



**Figura 13:** Efeitos da exposição crônica ao EtOH e pré-tratamento com Cafeína em ratas da adolescência à fase adulta no Tempo de Imobilidade do teste Nado Forçado. Os erros estão expressos como a média  $\pm$  e.p.m do tempo de imobilidade no tempo máximo de 5 minutos, com 10 animais por grupo. Teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. \* Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ); \*\* Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,01$ ); +++ Diferença significativa em relação ao grupo EtOH ( $p < 0,001$ ).

---

---

## **V DISCUSSÃO**

---

---

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a administração intermitente e episódica de EtOH na dose de 3g/kg/dia, da adolescência à fase adulta, provoca comportamento tipo ansioso e tipo depressivo, observados pela redução de entradas na área central no teste do Campo Aberto, redução de %EBA e %TBA no teste do LCE, redução no tempo de autolimpeza no teste Splash, característica da anedonia, e aumento no tempo de imobilidade no teste do Nado Forçado (WILLNER, 2005; PORSOLT, LE PICHON, JALFRE, 1977). Tais resultados já tinham sido anteriormente descritos em nosso grupo de pesquisa (BELÉM-FILHO *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2018). Porém, este estudo é inovador ao demonstrar que a cafeína (solução de cafeína na dose de 0,3g/L) administrada de forma crônica anteriormente à intoxicação pelo EtOH é capaz de provocar neuroproteção, fato observado pelo aumento do número de entradas e tempo na área central, aumento de %EBA e %TBA, aumento do tempo de autolimpeza e redução no tempo de imobilidade no grupo Cafeína + EtOH comparado ao grupo EtOH.

O modelo de intoxicação por EtOH em BD em ratas adolescentes foi escolhido a fim de mimetizar a realidade mundial atual. Esta forma de consumo, chamada de *binge drinking*, é caracterizada pela ingestão de altas doses de EtOH de forma intermitente e episódica, seguida por períodos de abstinência, alcançando concentrações acima de 80mg/dL de EtOH na corrente sanguínea (NIAAA, 2004; CREGO *et al.*, 2009; CREGO *et al.*, 2010). Nosso grupo de estudo ao realizar este protocolo de 4 sessões de BD mensurou a alcoolemia 1 hora após a última dose de EtOH administrada e o resultado foi de  $297,3 \pm 34,49$ mg/dL, confirmando a ocorrência de BD (FERNANDES *et al.*, 2018).

Um estudo realizado por Livy e colaboradores (2003) demonstrou que o pico de concentração de EtOH após administração por via oral é em torno de 60 minutos após a sua administração. Após 450 minutos, a concentração chega à zero. Um estudo do nosso grupo apresentou níveis de EtOH na corrente sanguínea de  $0,75 \pm 0,48$ mg/dL após 450 minutos da última dose de EtOH (FERNANDES *et al.*, 2018). Segundo Schulteis e Liu (2006), níveis inferiores a 10mg/dL de EtOH são

consideráveis como níveis não detectáveis de alcoolemia. Portanto, podemos afirmar que nossos achados demonstram os efeitos pós-uso desta substância.

Segundo Spear (2000; 2015), o consumo de álcool durante a adolescência é preocupante devido ao fato de o cérebro ainda estar em maturação nesse período da vida. Esta maturação tardia de áreas do sistema límbico está relacionada com o comportamento de impulsividade, ansiedade e desatenção (FERNANDES *et al.*, 2018; GUERRI e PASCUAL, 2010). Tal fato predispõe o adolescente a uma maior vulnerabilidade ao abuso de drogas, com consequente alteração comportamental e neuroquímica, além de predispor ao etilismo crônico na vida adulta (ANTONIETTE, 2010; BAVA *et al.*, 2010; SPEAR, 2000).

Além disso, Bonthius e West (1990) enfatizam que o consumo de EtOH em BD provoca maiores prejuízos cerebrais em comparação com o consumo contínuo. Prejuízos estes, que podem ser encontrados em demais estudos publicados na literatura como neurotoxicidade associada a aprendizagem e memória (CIPITELLI *et al.*, 2010), prejuízo na coordenação motora (FORBES *et al.*, 2013), comportamento semelhante à ansiedade (FERNANDES *et al.*, 2018) e depressão (BELÉM-FILHO *et al.*, 2018).

A depressão maior é uma das doenças psiquiátricas mais comuns e está associada ao transtorno de humor que ocorre de forma crônica e recorrente (WHO, 2012), além de estar em constante crescimento com o passar dos anos (YAMADA *et al.*, 2014), principalmente em mulheres, que constituem o grupo de maior impacto na depressão (WHO, 2008). A causa é multifatorial, variando entre fatores genéticos e ambientais (BERTON E NESTLER, 2006). O diagnóstico é baseado nos sintomas descritos no Manual de Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais da Associação Americana de Psiquiatria (2000), cujos sintomas de humor deprimido, perda de prazer (anedonia), perda ou ganho de peso, insônia, perda de energia, pensamentos de morte, dentre outros, persistindo por, no mínimo, duas semanas. A hipótese de mecanismo neurobiológico é a diminuição dos neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina (ESCUDEIRO *et al.*, 2013; WONG e LICINIO, 2011; HASHIMOTO, 2011).

A exposição ao EtOH na adolescência provoca aumento da liberação de dopamina no núcleo accumbens. No entanto, na retirada desta droga, ocorre a redução do fator de liberação de corticotrofina (CRF), levando à redução deste neurotransmissor. Desta forma, no BD, a retirada abrupta do EtOH está

consequentemente envolvida no comportamento tipo anedonia e tipo depressivo apresentado pelo grupo EtOH no teste Splash e Nado Forçado, respectivamente (BELÉM-FILHO *et al.*, 2018; VALDEZ *et al.*, 2002; BADANICH *et al.*, 2007; PASCUAL *et al.*, 2009; HEINZ *et al.*, 2005).

Diversos achados na literatura relatam haver forte ligação entre o efeito antidepressivo e as modulações que ocorrem nos receptores de adenosina no sistema nervoso central, mais precisamente os antagonistas do receptor de adenosina A2a. Escudeiro e colaboradores (2013) relatam que ratos *knockout* para antagonistas dos receptores de adenosina A2a apresentaram redução do tempo de imobilidade nos testes do nado forçado e suspensão da cauda. Corroborando com estes estudos, nossos achados demonstram a neuroproteção contra o efeito do tipo depressivo promovida pela cafeína nos testes Splash e Nado Forçado (YAMADA *et al.*, 2014; EL YACOUBI *et al.*, 2001).

Na literatura postula-se que a cafeína em baixas doses está associada ao menor risco de depressão em comparação com indivíduos que não fizeram uso desta substância (SMITH, 2009). Yamada *et al.* (2014) sugerem que o efeito da cafeína na depressão e suicídio acontece de forma dose-dependente, enquanto doses baixas a moderadas (2-6 xícaras de café/dia) estão associadas inversamente ao risco de suicídio, doses elevadas (>8 xícaras de café/dia) aumentam o risco. Assim como os achados do presente estudo, o autor afirma que a cafeína reduziu o tempo de imobilidade no teste do Nado Forçado, sugerindo que este efeito antidepressivo acontece por meio da inibição farmacológica não seletiva dos receptores adenosinérgicos. Todavia, os antagonistas de receptores A2a fornecem um início de ação antidepressivo rápido, sugerido pela redução na latência de escape no teste do desamparo aprendido, quando comparado com os antagonistas de receptores A1. Por esses motivos, sugere-se que os antagonistas de receptores A2a apresentam efeito antidepressivo mais amplo.

Ratos submetidos a estresse crônico durante 40 dias mostraram aumento na ligação do receptor A2a no estriado, dessa forma, sugere-se que os antagonistas deste receptor promovam a normalização desta regulação, resultando no efeito antidepressivo (CREMA *et al.*, 2013).

A ansiedade, por sua vez, pode ser considerada normal ou patológica, sendo diferenciada pela intensidade como acontece. A ansiedade normal é dita como aquela que acompanha o crescimento do indivíduo em situações como primeiro dia em um

novo emprego ou antes de realizar uma prova importante. Em contrapartida, a ansiedade patológica é considerada uma reação emocional desagradável frente a motivos não aparentes (REMES *et al.*, 2016; SIMPSON *et al.*, 2010).

A relação entre cafeína e ansiedade é dose-dependente, enquanto altas doses de cafeína podem ser ansiogênicas, baixas doses são consideradas ansiolíticas (YAMADA, 2014). Um estudo realizado por Koran, Aboujaoud e Gamel (2009) mostrou que a cafeína reduziu em 55% os sintomas de pacientes que sofriam de transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) refratário ao tratamento. Alsene, Deckert, Sand, & de Wit, 2003 sugerem uma associação entre os níveis de ansiedade e o polimorfismo ligado ao gene do receptor A2A.

Na literatura encontra-se que a administração de antagonista de receptor adenosinérgico A1 e A2A não seletivo produziu efeitos ansiogênicos em modelos de ansiedade como LCE e caixa claro/escuro (PREDIGER, BATISTA E TAKAHASHI, 2004; YAMADA, 2014). Em contrapartida, nossos achados sugerem que a administração de cafeína provocou efeito ansiolítico ao reduzir significativamente os parâmetros no teste do LCE, corroborando com os resultados encontrados por Caravan *et al* (2016).

---

---

## **VI CONCLUSÃO**

---

---

## 6. CONCLUSÃO

Neste paradigma podemos concluir que o consumo crônico de cafeína, consumida de forma e na dose habitual, conseguiu promover neuroproteção a nível comportamental ao reverter os sintomas semelhante a ansiedade e falta de prazer, característico da depressão, em ratos fêmeas adolescentes que receberam EtOH na dose de 3g/kg/dia em BD durante 4 semanas. Vale ressaltar a importância deste estudo ao salientar que o consumo de cafeína mimetiza uma média de padrão da população, ao ingerir diariamente cerca 250mg de cafeína (de 2 a 3 xícaras de café).

---

---

## **VII REFERÊNCIAS**

---

---

## REFERÊNCIAS

ACEVEDO, M.B.; NIZHNIKOV, M.E.; MOLINA, J.C.; PAUTASSI, R.M. Relationship between ethanol-induced activity and anxiolysis in the open field, elevated plus maze, light-dark box, and ethanol intake in adolescent rats. **Behav Brain Res**, v. 265: p. 203–215, 2014.

ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT. [Em linha]. Disponível em <<http://www.acdlabs.com/>>. Acesso em: 25 de Novembro de 2017.

American Psychiatry Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington, DC. 4th ed., 2000.

ALSENE, K.; DECKERT, J.; SAND, P. & WIT, H. Association between a2a receptor gene polymorphisms and caffeine-induced anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 28 (9): p. 1694-1702, 2003. .

BADANICH, K. A.; MALDONADO, A. M.; KIRSTEIN, C. L. Chronic ethanol exposure during adolescence increases basal dopamine in the nucleus accumbens septi during adulthood. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 31 (5): p. 895–900, 2007.

BAHI, A. Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 105: p. 83-88, 2013.

BARONE, J. J.; ROBERTS, H. R. Caffeine consumption. **Food Chem Toxicol**, v. 34 (1), p. 119–129, 1996.

BAVA S.; TAPERT, S.F. Adolescent Brain Development and the Risk for Alcohol and Other Drug Problems. **Neuropsychol Rev**, v.20 (4):p. 398-413, 2010.

BELÉM-FILHO, I. J. A.; RIBERA, P.C.; NASCIMENTO, A.L.; GOMES, A.R.Q.; LIMA, R.R.; CRESPO-LOPEZ, M.E.; MONTEIRO, M.C.; FONTES-JUNIOR, E.A.; LIMA, M.O; MAIA, C.S.F. Low doses of methylmercury intoxication solely or associated to ethanol binge drinking induce psychiatric-like disorders in adolescent female rats. **Enviro Toxicol Pharmacol**, v. 60: p. 184–194, 2018.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7(2): p. 137-51, 2006.

BERTOTTO, M.E.; BUSTOS, S.G.; MOLINA, V.A.; MARTIJENA, I.D. Influence of EtOH withdrawal on fear memory: effect of cycloserine. **Neuroscience**, v.142: p. 979–990, 2006.

BOISON, D. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. **Cur Opin Pharmacol**, v.8 (1): p. 2-7, 2008.

BONTHIUS, D.J.; WEST, J.R. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure. **Alcohol Clin Exp Res**, 14:107-118, 1990.

BRIONES, T.L.; WOODS, J. Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis. **Neuroscience**, v. 254: p. 324–334, 2013.

BURDAN, F. Caffeine in Coffee. In: *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier. p. 201–207, 2015.

CARAVAN, I.; SEVASTRE, B.A.; MOLDOVAN, R.; DECEA, N.; ORASAN, R.; FILIP, G.A. Modulatory effects of caffeine on oxidative stress and anxiety-like behavior in ovariectomized rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 94 (9): p.961-72, 2016.

CASILLAS-ESPINOSA, P. M.; POWELL, K. L. AND O'BRIEN, T. J. Regulators of synaptic transmission: Roles in the pathogenesis and treatment of epilepsy. **Epilepsia**, v. 53: p. 41–58, 2012.

CEDERBAUM, A.I. Alcohol metabolism. **Clin Liver Dis**, v. 16(4): p. 667-685, 2012.

CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL (CISA). Metabolismo do álcool. Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/artigo/5536/metabolismo-alcool.php>>. Acesso em: 12 de Fevereiro 2018.

CHEN, J. F., ELTZSCHIG, H. K., E FREDHOLM, B. B. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? **Nat Rev Drug Discov**, v. 12(4): 265-286, 201.

CIPPITELLI, A.; ZOOK, M.; BELL, L.; ESKAY, R.L.; SCHWANDT, M.; HEILIG, M. Reversibility of object recognition but not spatial memory impairment following binge-like alcohol exposure in rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 94: p. 538–546, 2010.

CORREA, M.; FONT, L. Is there a major role for adenosine a2a receptors in anxiety. **Frontiers in Bioscience**, p: 4058 – 4070, 2008.

CREGO, A.; HOLGUI'N, S.R.; PARADA, M.; MOTA, N.; CORRAL, M.; CADAVEIRA, F. Binge drinking affects attentional and visual working memory processing in young university students. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 33: p. 1870–1879, 2009.

CREMA, L. M.; PETTENUZZO, L. F.; SCHLABITZ, M., DIEHL, L., HOPPE, J.; MESTRINER, R. The effect of unpredictable chronic mild stress on depressive-like behavior and on hippocampal A1 and striatal A2A adenosine receptors. **Physiology & Behavior**, v.109: p. 1–7, 2013.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23 (5): p. 238–45, 2002.

CUNHA R.A, AGOSTINHO P.M. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. **J Alzheimers Dis**, v. 20 (11): p. 96-116, 2010.

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.

DEFRIES J.C; HEGMANN, J.P; WEIR, M.V. Open-field behavior: evidence for a major gene effect mediated by the visual system. **Science**, v.154: p. 1577-1579, 1966.

DUARTE, J.M.N.; CARVALHO, R.A.; CUNHA, R.A.; GRUETTER, R. Caffeine Consumption Attenuates Neurochemical Modifications In The Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **J. Neurochem**, v. 111: p. 368–379, 2009.

EL YACOUBI, M.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; BERTORELLI, R.; ONGINI, E.; COSTENTIN, J.; VAUGEOIS, J.M. Adenosine A2A receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A2A receptor knockout mice. **Br J Pharmacol**, v.134: p. 68-77, 2001.

ESCUDEIRO, S.S.; SOARES, P.M.; ALMEIDA, A.B., LOBATO, R.F.G.; ARAUJO, D.P; MACEDO, D.S.; SOUSA, F.C.F.; PATROCÍNIO, M.C.A.; VASCONCELOS, S.M.M. Antidepressant effect of aminophylline after ethanol exposure. **Sci Pharm**, v. 81: p.211-222, 2013.

FERNANDES, L.M.P.; CARTAGENES, S.C.; BARROS, M.A.; CARVALHEIRO, T.C.V.S.; CASTRO, N.C.F.; SCHAMME, M.G.; LIMA, R.R.; PREDIGER, R.D.; MONTEIRO, M.C.; FONTES-JUNIOR, E.A.; CUNHA, R.A; MAIA, C.S.F. Repeated cycles of binge-like ethanol exposure induce immediate and delayed neurobehavioral changes and hippocampal dysfunction in adolescent female rats. **Behav Brain Res**, 2018.

FERREIRA, G.M.H.; GUERRA, G.C.B.; GUERRA, R.O. Efeitos da cafeína na percepção do esforço, temperatura, peso corporal e frequência cardíaca de ciclistas sob condições de stress térmico. **Rev. Bras. Ciênc. Mov**, v.14 (2): p. 33-40, 2006.

FILS-AIME, M. L.; ECKARDT, M.J.; GEORGE, D.T.; BROWN, G.L.; MEFFORD, I.; LINNOILA, M.. Early-onset alcoholics have lower cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid levels than late-onset alcoholics. **Arch Gen Psychiatry**, v. 53 (3): p. 211–216, 1996.

FORBES, A.; COOZE, J.; MALONE, C.; FRENCH, V.; WEBER, J.T. Effects of intermitente binge alcohol exposure on long-term motor function in young rats. **Alcohol**, v. 47: p. 95-102, 2013.

FREDHOLM, B. B.; BATTIG, K.; HOLMEN, 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 (1): p. 83–133, 1999.

FREITAS, A. E.; MACHADO, D.G.; BUDNI, J.; NEIS, V.B.; BALEN, G.O.; LOPES, M.W.; DE SOUZA, L.F.; DAFRE, A.L.; LEAL, R.B.; RODRIGUES, A.L. Fluoxetine modulates hippocampal cell signaling pathways implicated in neuroplasticity in olfactory bulbectomized mice. **Behav Brain Res**, v. 237: p. 176–84, 2013.

GAO, Z.G, JACOBSON, KA. Emerging adenosine receptor agonists: an update. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 16: p. 597–602, 2011.

GELBER RP, PETROVICH H, MASAKI KH, ROSS GW, WHITE LR. Coffee intake in midlife and risk of dementia and its neuropathologic correlates. **J Alzheimers Dis**, v. 23: p. 607-615, 2011.

GIGLIOTTI, A; BESSA, M.A. Alcohol dependence syndrome: diagnostic criteria. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26:p. 11-13, 2004.

GONÇALVES, N.; SIMÕES, A.T.; CUNHA, R.A; ALMEIRA, L.P. Caffeine and Adenosine A2a receptor inactivations decrease striatal neuropathology in lentiviral-based modelo f Machado-Joseph disease. **Ann Neurol**, v.73: p. 655–666, 2013.

GUERRI, C.; PASCUAL, M. Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. **Alcohol**, v. 44: 15-26, 2010.

HASHIMOTO, K. The role of glutamate on the action of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Bio Psychiatry**, v. 35 (7): p. 1558-1568, 2011.

HECKMAN, M. A., WEIL, J., E GONZALEZ DE MEJIA, E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **J Food Sci**, v.75(3): p. 1750-3841, 2010.

HEINZ, A.; SIESSMEIER, T.; WRASE, J.; BUCHHOLZ, H.G.; GRUNDER, G.; JUMAKURA, Y.; CUMMING, P.; SCHRECKENBERGER, M.; SMOLKA, M.N.; ROSCH, F.; MANN, K.; BARTENSTEIN, P. Correlation of alcohol craving with striatal dopamine synthesis capacity and D2/3 receptor availability: a combined [18F]DOPA and [18F]DMFP PET study in detoxified alcoholic patients. **Am J Psychiatry**, v. 162 (8): p. 1515–20, 2005.

HIGGINS, G. A.; GRZELAK, M.E.; POND, A.J.; COHEN-WILLIAMS, M.E.; HODGSON, R.A.; VARTY, G.B. The effect of caffeine to increase reaction time in the rat during a test of attention is mediated through antagonism of adenosine A2a receptors. **Behav Brain Res**, v. 185: p. 32-42, 2007.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54 (1), p. 21–30, 1996.

INPAD–INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA POLÍTICAS PÚBLICAS DO ÁLCOOL E OUTRAS DROGAS. II levantamento nacional de álcool e drogas. Disponível em: < [www.inpad.org.br/lenad](http://www.inpad.org.br/lenad)>. Acesso em: 12 de Dezembro de 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em <<http://ibge.gov.br>>. Acesso em: 25 de Março de 2018.

ISINGRINI, E.; CAMUS, V.; GUIQUET, A.L.; PINGAUD, M.; BELZUNG, C.; Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PloS One**, v. 5 (4): p. e10404, 2010.

KARL, T.; PABST, R.; VON HÖRSTEN, S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. **Exp Toxicol Pathol**, v. 55 (1): p. 69–83, 2003.

KOLAHDOUZAN, M.; HAMADEH, M.J. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. **CNS Neurosci Ther.**, v.23: p: 272–290, 2017

KORAN, L.M.; ALBOUJAOUDE, E & GAMEL, N.N. Double-blind study of dextroamphetamine versus caffeine augmentation for treatment-resistant obsessive-compulsive disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 70 (11): p. 1530-1535, 2009.

KUMAR, A.; LAVOIE, H.A.; DIPETTE, D.J.; SINGH, U.S. Ethanol Neurotoxicity in the Developing Cerebellum: Underlying Mechanisms and Implications. **Brain Sci**, v. 3: p. 941-963, 2013.

LAUING, K.; HIMES, R.; RACHWALSKI, M.; STROTMAN, P.; CALLACI, J.J. Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. **Alcohol**, v. 42: p. 649-656, 2008.

LAURENT, C.; BURNOUF, S.; FERRY, B.; BATALHA, V.L.; COELHO, J.E; BAGI, Y.; MALIK, E.; MARCIANIK, E.; PARROT, S.; VAN DE JEUGD, A.; FAIVRE, E.; FLATEN, V.; LEDENT, C.; D'HOOGHE, R.; SERGEANT, N.; HAMDANE, M.; HUMES, S.; MULLER, C.E.; LOPES, L.V.; BLUEE, L.; BLUM, D. A2A adenosine receptor deletions is protective in a mouse model of Tauopathy. **Mol Psychiatry**, v. 21: p. 97-107, 2014.

LIVY, D.J.; PARNELL, S.E.; WEST J. R. Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. **Alcohol**, v.29: p. 165–171, 2003.

LÓPEZ-CRUZ, L.; SALAMONE, J.D.; CORREA, M. The impact of caffeine on the behavioral effects of ethanol related to abuse and addiction: A review of animal studies. **Journal of caffeine research**, v. 3: p. 1, 2013.

LORIST, M. M; TOPS, M. Caffeine, fatigue, and cognition. **Brain Cogn**, v.53: p. 82–94, 2003.

LUCAS, M.; O'REILLY, E. J.; PAN, A.; MIRZAEI, F.; WILLET, W. C.; OREKEKE, O. I.; ASCHERIO, A. Coffee, caffeine, and risk of completed suicide: Results from three prospective cohorts of American adults. **World J Biol Psychiatry**, v.15(5): p. 377–386, 2014.

LUCAS, M.; MIRZAEI, F.; PAN, A.; OREKEKE, O. I.; WILLET, W.C.; O'REILLY, E. J.; KOENEN, K.; ASCHERIO, A. Coffee, caffeine, and risk of depression among women. **Arch Intern Med**, v.171(17): p. 1571–1578, 2011.

MACHADO, N.J; SIMOES, A.P; SILVA, H.B; ARDAIS, A.P; KASTER, M.P; GARÇAO, P.; RODRIGUES, D,I; POCHMANN, D.; SANTOS, A.I; ARAUJO, I.M; PORCIUNCULA, L.O; TOME, A.R; KOFALVI, A.; VAUGEOIS, J.M; AGOSTINHO, P.; YACOUBI, E.L.; CUNHA, R.A.; GOMES, C.A. Caffeine Reverts Memory But Not Mood

Impairment In A Depression-Prone Mouse Strain Up-Regulated Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor In Hippocampal Glutamate Synapses. **Mol Neurobiol**, v. 54:p. 1552–1563, 2017.

MADEIRA, M.H.; BOIA, R.; AMBROSIO, A.F.; SANTIAGO, A.R. Having a Coffee Break: The impact of caffeine consumption on microglia-mediated inflammations in neurodegenerative diseases. **Mediators Inflamm**, v. 2017: p: 12, 2017.

MALDONADO-DEVINCCI, A.M.; BADANICH, K.A; KIRSTEIN, C.L Acohol during adolescence selectively alters immediate and long-term behavior and neurochemistry. **Alcohol**, v. 44: p. 57-66. 2010.

MARRONI, S.S.; NAKANO, F.N.; GATI, C.D.C.; OLIVEIRA, J.A.C.; ANTUNESRODRIGUES, J.; GARCIA-CAIRASCO, N. Neuroanatomical and cellular substrates of hypergrooming induced by microinjection of oxytocin in central nucleus of amygdala, an experimental model of compulsive behavior. **Mol Psychiatry**, v. 12: p. 1103–1117, 2007.

MIKALSEN, A.; BARTELTSEN, B.; FLATEN, M.A. Effects of caffeine, caffeine-associated stimuli, and caffeine related information on physiological and psychological arousal. **Psychopharmacology**, v.157: p.373–380, 2001.

MILLER, M. W. Effect of prenatal exposure to ethanol on glutamate and gaba immunoreactivity in macaque somatosensory and motor CORTices: critical timing of exposure. **Neuroscience**, v. 138: p. 97–107, 2006.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (NIAAA) 2004. National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism Council approves definition of binge drinking. Disponível em: <<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2018.

NIKODIJEVIC, O. & JACOBSON, K.A. Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v.44: p.199 – 216, 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global status report on alcohol and health. 2014. Disponível em: <[http://www.who.int/entity/whr/2002/en/whr02\\_en.pdf?ua=1](http://www.who.int/entity/whr/2002/en/whr02_en.pdf?ua=1)>. Acesso em: 02 de dezembro de 2017.

PANDOLFO, P.; PAMPLONA, F.A; PREDIGER, R.D.; TAKAHASHI, R.N. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. **Eur J Pharmacol**, v. 563 (1): p. 141–8, 2007.

PASCUAL, M.; BALIÑO, P.; ALFONSO-LOECHES, S.; ARAGÓN, C.M.G.; GUERRI, C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. **Brain Behav Immun**, v. 25: p. 80–91, 2011.

PASCUAL, M.; BOIX, J.; FELIPO, V.; GUERRI, C. Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and

glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the Adult rat. **J Neurochem**, v. 108, n. 4, p. 920–31, 2009.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 24: p.525-529, 1986.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14: p. 149-167, 1985.

PILATTI, A.; ETKIN, P.; PARRA, E.U.; PAUTASSI, R.M. Association between attendance to pregame events and alcohol-related consequences in Argentinean youth. **Health and Addic**, v. 18(1): p.5-16.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266 (5604): p. 730–732, 1977.

PREDIGER, R.D.S. Effects of Caffeine in Parkinson's Disease: From Neuroprotection to the Management of Motor and Non-Motor Symptoms. **J Alzheimer Dis**, v. 20: p. S205–S220, 2010.

PREDIGER, R.D.; BATISTA, L.C.; TAKAHASHI, R.N. Adenosine A1 receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. *European Journal of Pharmacology*, v.499 (1-2): p. 147-154, 2004.

REBOLA, N., SEBASTIÃO, A.M., DE MENDONÇA, A. Enhanced adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. **J. Europhysiol**, v. 90: p.1295-1303, 2003.

REMES, O.; BRAYNE, C.; VAN DER LINDEE R.; LAFORTUNE, L. A systematic review of reviews on the prevalence of anxiety disorders in adult populations. *Brain and Behavior*, v. 6(7), 2016.

RIBEIRO J.A, SEBASTIAO A.M, de MENDONCA A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. **Drug News Perspect**, v.16: p. 80-86, 2003.

RIEDEL, W., et al. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. **Psychopharmacology**, v. 122: p.158-168, 1995.

RIVERA-OLIVER, M; DÍAZ-RÍOZ, M. Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: a review. **Life Sciences**, v.101(1-2):p. 1–9, 2014.

ROMANO, M.; DUAILIBI, S.; PINSKY, I.; LARANJEIRA, R. Alcohol purchase survey by adolescents in two cities of State of Sao Paulo, Southeastern Brazil. **Rev. Saude Publ**, v.41: p. 495–501, 2007.

SANCHEZ, Z.M.; MARTINS, S.S.; OPALEYE, E.S.; MOURA, Y.G.; LOCATELLI, D.P.; NOTO, A.R. Social factors associated to binge drinking: a cross-sectional survey

among Brazilian students in private high schools. **BMC Public Health**, v. 11: p. 201, 2011.

SCHUCKIT, M.A. Alcohol-use disorders. **Lancet**, v. 373: p. 492-501, 2009.

SCHULTEIS, G.; LIU, J. Brain reward deficits accompany withdrawal (hangover) from acute ethanol in rats. **Alcohol**, v. 39: p 21-28, 2006.

SILVA, G. C.; CUNHA, R.A. Blockade of adenosine A2a receptors prevents staurosporine-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. **Neurobiol Dis**, v.27: p.182-189, 2007.

SILVERS, J. M.; TOKUNAGA, S.; BERRY, R.B; WHITE, A.M.; MATTHEWS, D.B. Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone, and the hippocampus. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 43 (3): p. 275–84, 2003.

SINCLAIR, C.J.; GEIDER, J.D. Caffeine use in sports: A pharmacological review. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 40: p. 71-9, 2000.

SMITH, A, et al. Effects of caffeine on human behavior. **Food Cheml Toxicol**, v.40: p.1243–1255, 2002.

SMITH, A.P. Caffeine, cognitive failures and health in a non-working community sample. **Hum. Psychopharmacol**, v. 24: p 29–34, 2009.

SOLIMAN, A. M.; FATHALLA, A. M.; MOUSTAFA, A. A. Dose-dependent neuroprotective effect of caffeine on a rotenone induced rat model of parkinsonism: a histological study. **Neurosci. Lett**, v, 623: p. 63–70, 2016.

SPEAR, L.P. Adolescent alcohol exposure: Are there separable vulnerable periods within adolescence?, **Physiol Behav**, v. 146: p. 122-130, 2015.

SPEAR, L.P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24: p. 417–463, 2000.

Substance Abuse and Mental Health Services Administration (2007). Results from the 2006 National Survey on Drug Use and Health: national findings. , NSDUH Series H-32. Office of Applied Studies. Rockville, MD: DHHS

TAPIA-ROJAS, C.; MIRA, R.G.; TORRES, A.K; JARA, C.; PÉREZ, M.J.; VERGARA, E.H.; CERPA, W.; QUINTANILLA, R.A. Alcohol consumption during adolescence: A link between mitochondrial damage and ethanol brain intoxication. **Birth Defects Research**. V.109:p.1623–1639, 2017.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic Stimuli in the Elevated Plus-Maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 44: p. 463-469, 1993.

VALDEZ, G. R.; ROBERTS, A.J.; CHAN. K.; BRENNAN, M.; ZORRILLA, E.P.; KOOB, G.F. Increased ethanol self-administration and anxiety-like

behavior during acute ethanol withdrawal and protracted abstinence: regulation by corticotropin-releasing factor. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 26 (10): p. 1494–501, 2002.

VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; MOLANDER, A.; SPANAGEL, R. Neuropharmacology of alcohol addiction. **Br J Pharmacol**, v.154: p. 299-315, 2008.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83 (3): p. 482–504, 1976.

WEI, C. J.; LI, W., E CHEN, J. F. Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808(5): p. 1358-1379, 2011.

WHO. Depression: a global public health concern. 2012.

WHO. The global burden of disease: 2004 update: World Health Organization. 2008.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52: p. 90–110, 2005.

WONG, D. T.; LI, T. Higher density of serotonin-1A receptors in the hippocampus and cerebral cortex of alcohol-preferring P rats. **Life Sci**, p. 231-235, 1990.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**, v. 2 (5): p. 343 - 351, 2001.

WOUDA, J. A; DIERGAARDE, L; RIGA,D; MOURIK, Y.V; SCHOFFELMEER, N.M; DE VRIES, T.J. Disruption of long-term alcohol-related memory reconsolidation: role of  $\beta$ -adrenoceptors and nmda receptors. **Front Behav Neurosci**, v. 4: p. 179, 2010.

YAMADA, K.; KOBAYASHI, M.; KANDA, T. Involvement of adenosine a2a receptors in depression and anxiety. **International Review of Neurobiology**, v.119: p. 373-393, 2014.

ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? **Alcohol Res Health**, v. 29: p. 245-254, 2006.

ZHOU, F. C.; PU, C.F; MURPHY, J.; LUMENG, L.; LI, T.K. Serotonergic neurons in the alcohol preferring rats. **Alcohol**, v. 11 (5): p. 397–403, 1994.

## ANEXO A – Parecer do CEPAE



**UFPA**  
Universidade Federal do Pará

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito neuroprotetor da cafeína em ratos fêmeas intoxicados por etanol no padrão binge.", protocolada sob o CEUA nº 8289260417, sob a responsabilidade de **Cristiane do Socorro Ferraz Maia** e equipe; **Mayara Arouck Barros**; **Cristiane do Socorro Ferraz Maia** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 20/07/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of the neuroprotective effect of caffeine in female rats intoxicated by ethanol in the binge pattern.", utilizing 40 isogenic rats (40 females), protocol number CEUA 8289260417, under the responsibility of **Cristiane do Socorro Ferraz Maia** and team; **Mayara Arouck Barros**; **Cristiane do Socorro Ferraz Maia** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 07/20/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2017** a **03/2019** Área: **Farmácia**

Origem: **Biatório Central ICB/UFPA**

Espécie: **Ratos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **18 a 21 dias**

N: **40**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **80 a 250 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento, da Faculdade de Farmácia, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará.

Belé, 15 de maio de 2018

*M<sup>a</sup> Viviana B. Monteiro*

Profa. Dra. Maria Viviana Barros Monteiro  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

*Vanessa Joia de Mello*

Profa. Dra. Vanessa Joia de Mello  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará