



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**EFEITO DA CAFEÍNA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
COGNITIVAS DECORRENTES DA SEPSE EXPERIMENTAL**

MELISSA SOUSA DE ASSIS

BRASÍLIA-DF
2014

MELISSA SOUSA DE ASSIS

**EFEITO DA CAFEÍNA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
COGNITIVAS DECORRENTES DA SEPSE EXPERIMENTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Vania Maria Moraes Ferreira

BRASÍLIA-DF

2014

MELISSA SOUSA DE ASSIS

**EFEITO DA CAFEÍNA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
COGNITIVAS DECORRENTES DA SEPSE EXPERIMENTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas em Saúde.

Aprovada em 06 de Março de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vania Moraes Ferreira
(Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia
(Membro titular externo)
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Vaneila Ferreira Martins
(Membro titular externo)
Universidade Federal do Goiás

Profa. Dra. Eliza Carla Barroso Duarte Veríssimo
(Membro suplente)
Universidade de Brasília

BRASÍLIA-DF

2014

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais mediadores da sepse.....	21
Figura 2 – Esquema da regulação dos receptores adenosinérgicos	27
Figura 3 – Procedimentos cirúrgicos.....	41
Figura 4 – Teste do Campo aberto.....	43
Figura 5 – Teste do Labirinto em cruz elevado.....	44
Figura 6 – Teste do Nado forçado	45
Figura 7 – Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	46
Figura 8 – Teste de Reconhecimento social.....	48
Figura 9 – Delineamento experimental.....	49
Figura 10 – Efeitos da cafeína no Teste do Campo aberto	52
Figura 11 – Efeitos da cafeína no Teste do Labirinto em cruz elevado	52
Figura 12 – Efeitos da cafeína no Teste do Nado forçado.....	54
Figura 13 – Efeitos da cafeína pré- e pós-procedimentos cirúrgicos no Teste da Esquiva inibitória	55
Figura 14 – Efeitos da cafeína pós-procedimentos cirúrgicos no Teste da Esquiva inibitória.....	56
Figura 15 – Efeitos da cafeína pré e pós-procedimentos cirúrgicos no Teste de Reconhecimento social	56
Figura 16 – Efeitos da cafeína pós-procedimentos cirúrgicos no Teste de Reconhecimento social	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofosfato-cíclico
ANOVA.....	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fatores de neutrófilos derivados do cérebro
CAF.....	Cafeína
CLPC	Cirurgia de ligadura e perfuração cecal
CEUA.....	Comitê de Ética no Uso Animal
EBA.....	Entradas nos braços abertos
EBF	Entradas nos braços fechados
FECG	Fatores estimulantes de colônia de granulócitos
GABA	Ácido gama amino butírico
i.p.	Via intraperitoneal
IL-1.....	Interleucina 1
IL-6.....	Interleucina 6
IL -10.....	Interleucina 10
IMAO.....	Inibidores monoaminoxidases
LPS	Lipopolissacarídeos
LCE.....	Labirinto em cruz elevado
MCD.....	Memória de curta duração
MLD	Memória de longa duração
OF	Operação fictícia
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
s.c	Via subcutânea
SAL	Salina
SNC	Sistema Nervoso Central
SIRS.....	Síndrome de resposta inflamatória sistêmica
TBA.....	Tempo nos braços abertos
TBF	Tempo nos braços fechados
TNF	Fator de necrose tumoral
UTI.....	Unidade de Terapia Intensiva

Dedico esta Dissertação de Mestrado aos meus pais, por terem acreditado em mim. Estejam certos de que ela foi feita com muito empenho, afinco e horas de total entrega para sua finalização, pautados na ausência de alguns momentos familiares, porém válidos em presença acadêmica marcante.

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, fonte inesgotável de minha superação pessoal, diante de perda sofrida e irreparável que ocorreu no período de início e conclusão do Mestrado, estando presente desde o meu acordar ao meu dormir, derramando suas bênçãos inenarráveis.
- A Prof.^a Vania Ferreira, que no início indicaria termos apenas relação acadêmica orientador e orientando, mas foi a primeira Professora, de uma vida inteira nesse meio educacional, que esteve engajada totalmente com tal função, despertando em mim além do profissionalismo, competência, inteligência afinada, total dedicação, amor ao trabalho árduo, alegria pessoal, sorriso protetor, rigor nos prazos, minha total admiração. Fica pequeno apenas descrever algumas palavras diante da minha tamanha e longínqua gratidão, crendo na surpreendente e marcante mudanças de vidas adquiridas nesse contato acadêmico. O meu muito obrigada!
- A CAPES pela bolsa de estudos durante o período do Mestrado, minha fonte de recurso financeiro essencial.
- Aos funcionários da Secretaria do Programa da Pós-Graduação em Ciências Médicas Alessandro, Carolina e Denis, pela gentil e paciente ajuda quando sempre os recorri para sanar as minhas dúvidas acadêmicas.
- Ao Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina, pelo apoio constante na realização desta pesquisa.
- Ao Biotério da Faculdade Sena Aires (Valparaíso de Goiás-GO), pelos animais experimentais.
- Ao Sr. Dedé, técnico da Faculdade de Saúde, da Universidade de Brasília, pelos cuidados animais.
- Aos meus pais, propiciadores desde os primórdios de minha vida, do total apoio, incentivo, ânimo, carinho, compreensão e recursos financeiros,

presentes na construção diária e eterna do meu conhecimento. São vocês que me suportam sem medir esforços, sempre de prontidão a me socorrer e um amor incondicional, programados para estar comigo até o nosso último suspiro.

- Ao meu Pai José Melo (*in memoriam*), que tinha o maior orgulho de me ver vencer os obstáculos, incentivador para que eu não desistisse. Ao senhor meu Pai, fica aqui o meu eterno agradecimento.
- Aos meus familiares, irmãos e sobrinhos, sempre na torcida positiva, destacando a minha irmã Mona Lisa de Assis Bittencourt confiante de minhas limitações e angústias, ao qual me acolheu junto ao seu esposo, meu cunhado Heraldo Bittencourt, durante o primeiro ano em sua residência.
- Aos Professores Dr. Florêncio Figueiredo e Dr^a Eliza Veríssimo pelas conversas de incentivo em momentos “conturbados” do dia-a-dia laboratorial.
- Aos colegas colaboradores Aluizio e João Eudes pelas excelentes contribuições nas realizações experimentais.
- As alunas PIBIC da graduação em Medicina Karla Amaral e Sthéfanie Marchiori pela ajuda nos procedimentos experimentais.
- As amigas Fabielle Zorzin, Joice Vital, Flávia Mascarenhas, Priscilla Carneiro, Carolina Bardolle, Liane Barros, Abadia Ribeiro, pelos momentos introspectivos.

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".

Fernando Pessoa

RESUMO

A cafeína é uma metilxantina muito consumida pela população por suas propriedades psicoestimulantes. Sua ingestão diária nos chama a atenção por seus efeitos na redução de estresse, melhora do humor e memória, possivelmente mediada pelos receptores adenosinérgicos. Estes receptores, por sua vez, parecem estar envolvidos com o processo de infecção. Esta pesquisa, portanto, procurou investigar os efeitos da cafeína nas alterações comportamentais e déficits cognitivos de ratos com sequelas decorrentes de um quadro infeccioso sistêmico. Para tal, foram usados ratos Wistar machos (n=80), anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), seguidos dos procedimentos cirúrgicos de indução de sepse ou operação fictícia (OF). Solução salina ou cafeína (10 mg/kg) foi administrada por gavagem durante uma semana antes e/ou uma semana após os procedimentos cirúrgicos. Os animais foram divididos em: Grupo 1 (OF+Salina), Grupo 2 (OF+Cafeína); Grupo 3 (Sepse+Salina) e Grupo 4 (Sepse+Cafeína). Após uma hora da última administração das substâncias, os animais foram avaliados nos testes experimentais do Campo aberto, Labirinto em cruz elevado (LCE), Nado forçado, Esquiva inibitória e Reconhecimento social. Foi observado que os animais que sobreviveram à sepse reduziram seu percentual de entradas (%EBA) e tempo de permanência nos braços abertos (%TBA) do LCE. Nenhuma diferença significativa foi detectada no número de ambulações no teste do Campo aberto e na frequência de entradas nos braços fechados (EBF) do LCE. Além disso, esses animais aumentaram o tempo de imobilidade no teste do Nado forçado, sugestivo de comportamento depressivo. Houve também prejuízo tanto na aquisição quanto na retenção de memória demonstradas pela diminuição no tempo de permanência dos animais na plataforma, sem alteração no Teste do Reconhecimento Social. Quando a cafeína foi administrada aos animais sobreviventes à sepse, em um regime de tratamento subcrônico (pré e pós-procedimentos cirúrgicos), aumentou o %TBA no LCE, resposta sugestiva de atividade ansiolítica, visto que os parâmetros de locomoção e EBF não foram afetados. O tempo de imobilidade também foi reduzido no teste do Nado forçado, comportamento sugestivo de resposta antidepressiva. Além disso, observou-se um aumento no tempo de permanência dos animais que sobreviveram à sepse na plataforma da Esquiva inibitória, sem alteração no Teste do Reconhecimento social. Resultados similares foram observados quando os animais foram administrados com a cafeína somente durante uma semana pós-procedimentos cirúrgicos, com exceção daqueles observados no LCE, onde não se observou diferença estatística entre os animais que sobreviveram à sepse e os controles. Em um contexto geral, esses resultados mostram que os efeitos da cafeína, provavelmente vias receptores adenosinérgicos, têm um papel importante nas alterações comportamentais e déficits cognitivos produzidos pela sepse induzida experimentalmente em ratos.

Palavras-chave: Ansiedade, Cafeína, Depressão, Locomoção, Memória, Sepse.

ABSTRACT

Caffeine is a methylxanthine very consumed by the population for its psychostimulant properties. Your daily intake draws our attention to its effect on stress reduction, improved mood and memory, possibly mediated by adenosinergic receptors. In turn, these receptors seem to be involved in the infection process. Therefore, this study sought to investigate the effects of caffeine on behavioral changes and cognitive deficits in rats with sequelae resulting from a systemic infection. To this end, male Wistar rats were used (n= 80) were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) followed by surgical procedures for induction of sepsis or sham operation (Sham). Caffeine or saline (10 mg/kg) solution was administered by gavage during one week prior and/or one week after surgical procedures. The animals were divided into Group 1 (Sham + Saline), Group 2 (Sham + Caffeine), Group 3 (Sepsis + Saline) and Group 4 (Sepsis + Caffeine). After an hour of the last administration of the substances, the animals were evaluated in open field, elevated plus maze (EPM), forced swimming, inhibitory avoidance and social recognition tests. It was observed that the animals that survived sepsis reduced their percentage of open arm entries and time spent in these arms of the EPM. No significant difference was detected in the number of ambulations in the open field test and the frequency of enclosed arms entries of the EPM. Moreover, these animals increased the immobility time in the forced swimming test, suggesting a depressive behavior. There was also damage both in acquisition and retention of memory as demonstrated by the decrease in latency of the animals on the platform of the inhibitory avoidance test without changings in the social recognition test. When caffeine was administered to sepsis survivors animals, in a subchronic treatment (pre-and post-surgical procedures), increased the percentage of open arm time in the EPM, suggestive of anxiolytic-like activity, as the parameters of locomotion and frequency in enclosed arms were not affected. Such behavior did not occur when caffeine was administered on a regimen of acute treatment. This psychostimulant also decreased the immobility time in the forced swimming test, behavior suggestive of antidepressive effect. Caffeine also increased the latency of the sepsis survivors animals in the platform of inhibitory avoidance test without changings in the social recognition test. In a general context, these results show that the effect of caffeine, probably by adenosinergic receptors, plays an important role in behavioral changes and cognitive deficits produced by experimental sepsis in rats.

Keywords: Anxiety, Caffeine, Depression, Locomotion, Memory, Sepsis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Sepsis: aspectos gerais	21
1.2 Papel do sistema adenosinérgico nas condições fisiológicas	25
1.3 Interferência da cafeína no sistema adenosinérgico	30
1.4 Efeitos do sistema adenosinérgico e cafeína no SNC	34
2 OBJETIVOS	37
3 METODOLOGIA	39
3.1 Animais	40
3.2 Drogas e soluções	40
3.3 Cirurgia de Ligadura e Perfuração Cecal	41
3.4 Modelos experimentais	42
3.4.1 Teste do Campo aberto	42
3.4.2 Teste do Labirinto em cruz elevado	43
3.4.3 Teste do Nado forçado.....	45
3.4.4 Teste da Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	46
3.4.5 Teste do Reconhecimento Social.....	47
3.4.6 Desenho Experimental.....	49
3.5 Análise estatística	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Teste do Campo aberto	52
4.2 Teste do Labirinto em cruz elevado	52
4.3 Teste do Nado forçado.....	54
4.4 Teste da Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	54
4.5 Teste do Reconhecimento Social.....	56
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÕES	66
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO	85
Comprovante do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA)	86

APRESENTAÇÃO

Tive uma experiência com ente próximo decorrente de internação hospitalar vitimado por um quadro infeccioso, me levando a pensar em sua melhoria, bem como alternativas terapêuticas contemporâneas, aliadas aos produtos farmacológicos conhecidos e usados clinicamente e/ou terapias medicinais tradicionais. Assim ocorreu em minha vida profissional, pois sou Fisioterapeuta de formação profissional e escolha pessoal, onde meu foco principal sempre foi a busca na reabilitação e/ou recuperação de pacientes. Meu parente próximo, depois de 45 dias em coma profundo e superação ao quadro infeccioso adquirido em leito hospitalar, teve uma seqüela de confusão mental.

Passados os dias de agonia, quando retornei minha rotina diária em meio familiar, comecei meu despertar de que este ente querido tinha sido acometido por um déficit cognitivo. O diagnóstico médico não me tinha sido animador, começando ali o aprofundamento e conhecimento sobre o que seria essa confusão mental, classificada pela médica acompanhante, de encefalopatia séptica.

Comecei a buscar em minha formação acadêmica especializações voltadas aos tratamentos humanizados, realizei cursos de formação livre e manual, acupuntura, shiatsu, tai chi chuan, yoga e meditação para auxiliar nas seqüelas que o ente próximo sempre relatava. Foi quando surgiu, em paralelo as minhas formações pessoais, diversas buscas literárias acerca do assunto, com base em centenas de artigos científicos, livros digitais, vídeos, livros tradicionais e anexos de revistas eletrônicas.

Paralelamente a esse grande infortúnio pessoal, recebi a proposta de mudança de cidade, saindo de Campina Grande para morar em Brasília, na possibilidade de galgar em um futuro mestrado. Assim foi feito, resolvi encarar grande desafio e realizei a mudança. Chegando em Brasília, tive acesso à Universidade de Brasília para cursar disciplinas como aluna especial, me possibilitando o conhecimento de pessoas diferentes, principalmente via e-mail.

No dia 03 de março de 2011 tive o primeiro contato com quem viria a ser minha futura orientadora, a Profa. Vania Ferreira, sempre gentil e prestativa, abraçando-me já em primeiro momento. Os contatos pessoais iniciais foram feitos

e várias disciplinas foram cursadas, até a aprovação no processo de seleção, com o desempenho e total dedicação para a conclusão dessa Dissertação, ao qual me foi motivada, a priori, pela situação do ente querido.

Chegando a esta etapa final, apresento a Dissertação de Mestrado assim disposta, contendo 8 partes: onde no primeiro capítulo encontra-se a **Introdução** com resumos da relevância ao título e tema, com os subitens: Sepsis e seus aspectos gerais, o papel do sistema adenosinérgico nas condições fisiológicas normais e alteradas. Interferência da cafeína no sistema adenosinérgico e a participação do sistema adenosinérgico no comportamento e cognição. Os **Objetivos** (geral e específico) serviram de alvos para nossas investigações laboratoriais.

Nos **Materiais e métodos** foram descritos os procedimentos laboratoriais que geraram os resultados de nossa pesquisa, incluindo os animais, drogas e soluções, os procedimentos cirúrgicos, os testes experimentais: campo aberto (locomoção), labirinto em cruz elevado (ansiedade), nado forçado (depressão), esquivas inibitórias do tipo *step-down* e o reconhecimento social (memória).

Na sequência, os **Resultados** foram descritos e avaliados estatisticamente para, posteriormente, serem discutidos na **Discussão**. Nesta seção, os achados científicos foram respaldados cientificamente pelas literaturas pesquisadas, reunidas nas **Referências bibliográficas**, num total de 119 artigos científicos.

Foram destacados nas **Conclusões e Considerações finais** os efeitos da cafeína nas alterações comportamentais e cognitivas decorrentes da sepsis experimental, chamando atenção para o possível envolvimento dos receptores adenosinérgicos como sua via de interferência, constituindo um possível alvo de investigação para o quadro de infecção sistêmica que caracteriza a sepsis.

1. | INTRODUÇÃO

A sepse é definida como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) abrangendo vários sinais e sintomas que emanam da resposta do organismo frente aos microorganismos invasores (BALK, 2014). Seu termo deriva da palavra grega "cepo", que significa a deterioração e/ou decomposição do animal, do vegetal ou matéria orgânica na presença de infecção bacteriana grave nos tecidos do corpo (MAYER et al., 2013).

As alterações nos múltiplos sistemas orgânicos são tão graves, que podem evoluir rapidamente com perda de suas funções (BOOMER et al., 2014; RONCO, 2014). Em decorrência disso, essa infecção se traduz numa das principais causas de morte em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), com taxa de mortalidade superior a 50%, competindo com o trauma complicado com síndrome de disfunção múltipla dos órgãos (SURBATOVIC et al., 2013). Assim, apresentando uma complexidade biológica alarmante, esse quadro de resposta inflamatória sistêmica quando ativado infecciosamente e não infecciosamente (trauma, por exemplo) pode causar danos irreversíveis bem como permitir sobrevivência com alterações em diversos estados biopsicossociais (MARSHALL, 2014).

A sepse tem alta incidência, morbidade e mortalidade, fazendo com que os custos financeiros substanciais, especialmente devido a complicações como choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos direcionem estudos para reduzir seus gastos. A sua incidência foi estimada em 9% ao ano nos Estados Unidos da América (EUA), com um custo anual de 17 bilhões de dólares (CORDIOLI et al., 2013; MARTIN et al., 2003).

Como as suas taxas de mortalidade não melhoraram, de forma significativa na última década, as diretrizes lançadas pela campanha promovida pelo *Surviving Sepsis Campaign* (SSC), em 2012, enfatizaram o reconhecimento precoce e seu tratamento, em um esforço para reduzir a sua alta taxa de mortes em todo o mundo (MAYER et al., 2013). Embora as campanhas tenham divulgado várias estratégias para conter estas as infecções, uma desregulação da resposta do organismo pode conduzir a resultados alarmantes como uma resistência à exposição subsequente normalmente letal para os microorganismos que,

normalmente, proliferam diante da contaminação hospitalar (BLOOS e REINHART, 2014; MUSIE et al., 2014).

Estudos sobre a sepse em humanos, portanto, são sempre de grande relevância na busca de amortizar suas consequências deletérias graves. Contudo, são de difícil acesso devido à sua gravidade, a qual limita os estudos clínicos (WIERSINGA, 2011). Dessa forma, vários são os fatores que podem neles estarem implicados: aumento da expectativa de vida, um maior número de comorbidade associadas, procedimentos invasivos, transplantados e/ou indivíduos imunodeprimidos, e um aumento da prevalência de resistência bacteriana (ANGUS et al., 2001; ANGUS e WAX, 2001).

Portanto, muito progresso foi feito nas últimas duas décadas na compreensão dos mecanismos envolvidos na sepse, mas os dados ainda merecem especial atenção com esse quadro nos ambientes hospitalares intensivos, por ter sérias sequelas aos seus sobreviventes, demanda altos gastos públicos (MAYER et al., 2013).

Em virtude de sua gravidade e do impacto econômico e social que é gerado no mundo, a sepse e suas repercussões clínicas merecem ser estudadas e o conhecimento sobre esse tema merece ser aprofundado. Assim sendo, a gravidade da síndrome séptica tem recebido muita atenção nas pesquisas multiprofissionais, que não visam somente atender a demanda dos hospitais públicos, no que concerne a diminuição de gastos, mas buscam também encontrar soluções ou estabelecer condutas frente às diversas alterações e/ou sequelas das respostas do organismo às infecções sistêmicas (O'CONNOR e SPAGNOLA, 2009).

Marshall (2014) em uma revisão atual com mais de 100 ensaios clínicos randomizados testou a hipótese de que a intervenção na resposta à infecção séptica pode melhorar a sobrevivência do paciente. Entretanto, os ensaios apresentados chamaram a atenção pela importância da intervenção precoce, mas não sinalizou possibilidade em novos tratamentos. Chamou-se a atenção para a importância de se investir em grandes estudos de epidemiologia clínica e bioquímica para compreender o curso da doença, melhor integração da ciência

básica e clínica, a criação de sistemas de estratificação para direcionar o tratamento para com aqueles que precisam de intervenções precoces, e possibilidades de reversões nas condições de ordens comportamentais e cognitivas.

Se as condições advindas da sepse, que interrompem a homeostasia celular, estiverem associadas aos fatores que alteram a defesa do indivíduo, desse modo, em seus estágios mais avançados, comprometem a imunidade e os sistemas do corpo, envolvendo os mecanismos inflamatórios e a cascata de coagulação (BOOMER et al., 2014). Além disso, essa resposta inflamatória pode levar ao comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC), o que pode desencadear alterações comportamentais graves e perda de concentração e/ou função cognitiva, alterações na memória e atenção (SURBARTOVIC et al., 2013).

Tendo em vista as graves alterações que esse tipo de infecção pode desencadear, um dos principais focos das pesquisas atuais visa descobrir alternativas terapêuticas para tratá-la, em especial contra as sequelas decorrentes da encefalopatia séptica, uma das manifestações mais sérias observadas em pacientes sobreviventes à sepse (FANG et al, 2014; PYTEL e ALEXANDER, 2009).

Atualmente, as pesquisas têm avançado com o intuito de entender a fisiopatologia da sepse, já que para se estabelecer um tratamento adequado e melhorar a sobrevida dos pacientes é necessário saber a sua base molecular. Tais estudos têm representado um avanço na terapia de suporte ao paciente séptico e no desenvolvimento de novas alternativas farmacológicas (KUMAR, 2013; ROMAY e FERRER, 2014; RONCO, 2014).

Os estudos realizados nessa área são bastante abrangentes e envolvem diversas vias conhecidas do sistema imunológico e da resposta inflamatória. Destaque tem sido dado ao sistema adenosinérgico, considerando que este atua como uma espécie de regulador homeostático de rede energética, em que a adenosina tem um papel importante na modulação das funções imunes, incluindo processos inflamatórios envolvendo citocinas no encéfalo. As lesões encefálicas são conhecidas por gerar, grande parte das vezes, níveis excessivos de

adenosina, uma vez que cursam com deficiência no seu *clearance* metabólico (ASCHERIO et al., 2011).

A adenosina é produzida principalmente a partir do metabolismo de adenosina trifosfato (ATP) e exerce várias funções em todo o corpo, sendo peça importante no SNC, na modulação da liberação de neurotransmissores, plasticidade sináptica e neuroproteção em eventos isquêmicos, hipóxia e estresse oxidativo. Além disso, desempenha funções diferentes numa grande variedade de tecidos (SHETH et al., 2014).

Sabendo-se que a cafeína tem uma participação direta nos receptores de adenosina, essa substância atua em diferentes sistemas biológicos, com destaque ao SNC, devido ao seu poder excitatório. É uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo, apresentada nas diversas fontes de bebidas (exemplos: guaraná, chá, café, chocolate, outros) como consumos primários diários, e também em formas de alimentos (ARAB et al., 2013).

Apesar de vários trabalhos na literatura pontuarem as propriedades estimulantes da cafeína nas alterações comportamentais e cognitivas, nenhum relato, até então, mostrou a sua participação em eventos infecciosos *in vivo*. No entanto, como essa substância interfere nos receptores adenosinérgicos, onde vários trabalhos mostraram suas participações nos referidos eventos, é possível que este psicoestimulante, possa mediar, de alguma forma as sequelas centrais decorrentes da sepse. Coube aqui nosso interesse nessa investigação acerca desses possíveis efeitos.

1.1 Sepsis: aspectos gerais

A sepsis é uma síndrome complexa multifatorial deflagrada após a liberação de lipopolissacarídeos bacterianos ou outras substâncias microbianas nos sistemas circulatório, linfático, pulmonar, cardiovascular, renal e disfunção gastrointestinal. Quando a cascata séptica é ativada, uma importante desregulação se inicia, de modo a progredir rapidamente para uma caracterização clínica resultante em falência de múltiplos órgãos (STRECK et al., 2008), conforme demonstrada na Figura 1.

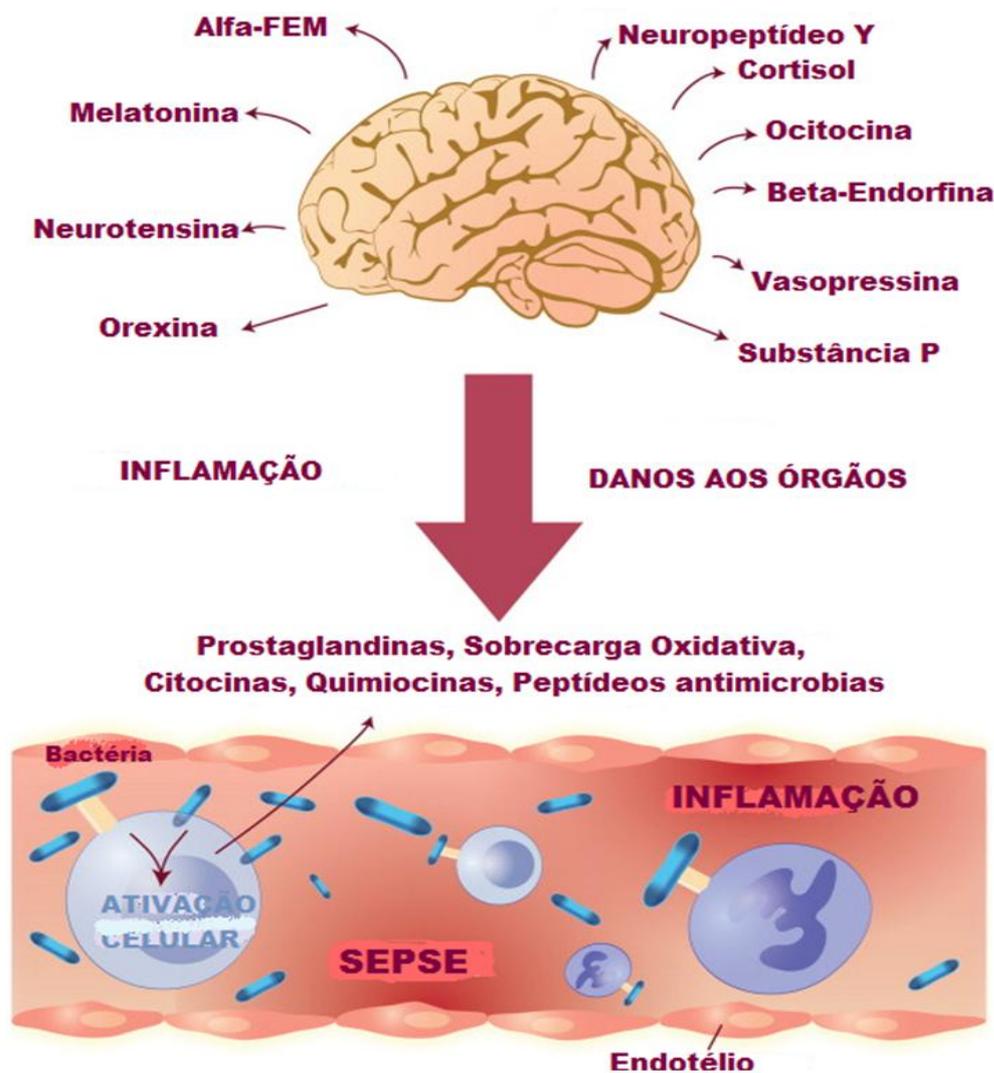


Figura 1 – Principais mediadores inflamatórios relacionados com a sepsis mostrando a cascata da ação das substâncias envolvidas no processo de instalação da sepsis (Modificada de PINHEIRO DA SILVA et al., 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a sepse é um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil, sendo considerada com alto índice de prevalência entre pacientes hospitalizados, surgindo como uma das principais causas de mortalidade hospitalar tardia, superando o infarto agudo do miocárdio e a neoplasia maligna. Sua alta mortalidade chega a 65% dos casos, representando 200.000 mortes por ano, enquanto a média mundial está em torno de 30-40%, com 150.000 casos de óbitos. Com base nesses resultados, um levantamento feito pelo estudo *Progress* mostrou que a mortalidade por sepse em nosso País é maior do que a de outros, como a Índia e a Argentina (WHO, 2010). A detecção precoce desse tipo de infecção continua sendo um grande desafio para os clínicos, sendo que os diagnósticos tardios frequentemente prejudicam os seus esforços de tratamento, contribuindo para a alta mortalidade (LIU et al., 2014).

Portanto, dada a sua gravidade, frente o caráter sistêmico e rapidamente progressivo, pode-se compreender a razão da sepse ser uma das mais importantes complicações infecciosas da medicina contemporânea, já que apresenta alta incidência e grande potencial de evolução para o óbito (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2012). A compreensão dos mecanismos de ação de novos alvos terapêuticos pode favorecer a redução dessa patogenia e fisiologia alterada, com base nos estudos celulares e moleculares de disfunção de múltiplos órgãos (YAMADA, 2008).

Alterações nas funções fagocitárias, linfocíticas nas células endoteliais e regulação imune são evidenciadas nesse quadro, levando a uma heterogeneidade na resposta do hospedeiro. O equilíbrio homeostático normal desloca-se para um estado pró-coagulante por meio de alterações no fator tecidual, antitrombina, proteína C e a inibição da fibrinólise, o que pode resultar na formação de trombos e insuficiência hemostática paradoxal (KING et al., 2014). Além disso, muitos mecanismos são responsáveis pela imuno-supressão induzida por sepse, incluindo esgotamento apoptótico de células do sistema imunológico, aumento de células supressoras reguladoras e derivadas de mielóide T, exaustão celular, proliferação e produção de citocinas (BALK, 2014; SHETH et al., 2014).

Na sepse, um mediador bastante estudado é o interferon-gama que é um importante regulador da infecção e inflamação, o qual é liberado em pequenas quantidades durante o período inicial da inflamação beneficiando o hospedeiro e impedindo a saída das bactérias. Em um período mais tardio observa-se um aumento nos seus níveis o que pode ser benéfico por estimular o sistema de defesa do corpo (WANG et al., 2014).

Em um esforço para diagnosticar sepse e prever seus resultados, a necessidade da investigação dos biomarcadores, como a proteína C reativa, pró-calcitonina, citocinas pró e anti-inflamatórias. Assim, as alterações imunopatológicas e coagulopáticas que ocorrem nesse tipo de infecção estão correlacionadas aos mediadores inflamatórios como potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico e manejo clínico do paciente séptico (KING et al., 2014).

Inicialmente, foi presumido que esses mediadores apenas interferem com a replicação viral, mas estudos experimentais subsequentes mostraram que ele protege também o indivíduo contra infecções bacterianas, e fungos patogênicos. Sua função mais importante é a de ativação de macrófagos, que auto-regula a expressão dos complexos principais de histocompatibilidade I e II, sendo então envolvidos nas vias de processamento e apresentação de antígenos, também mediando funções como atração de leucócitos, maturação e diferenciação da atividade das células e produção de imunoglobulina (WANG et al., 2014).

Com a necessidade do conceito definido da patogênese da sepse, em relação as suas complicações múltiplas infecciosas, ela continua a ser uma séria ameaça aos pacientes. Quanto mais tempo o quadro séptico persiste, maiores são as chances de um paciente desenvolver um profundo aumento na imunossupressão, o que explica o fato dos pacientes sofrerem uma alta taxa de infecção hospitalar (BOOMER et al., 2014; JUNG et al., 2013).

Apesar de uma série de ensaios clínicos realizados na área, vários protocolos de tratamento ou de gestão têm sido mostrados ser eficazes no combate à sepse e septicemia (MAYER et al., 2013). Embora questões críticas permaneçam sem respostas, esses novos conhecimentos na compreensão da

resposta imune sobre os seus mecanismos são susceptíveis de conduzir a abordagens terapêuticas eficazes, que podem melhorar a evolução clínica dos pacientes (BALK, 2014; STECKERT et al., 2014).

A encefalopatia séptica se destaca como uma das mais sérias sequelas neurológicas, sendo considerada uma complicação frequente que ocorre no SNC em decorrência da desregulação dinâmica de uma rede complexa de sistemas. Muitas vezes, ela se manifesta antes mesmo do comprometimento de outros órgãos e sistemas (PYTEL e ALEXANDER, 2009). É importante entender a sua patogênese que, por sua vez, permitirá investigar drogas para evitar a sua influência negativa na sobrevivência dos pacientes (SALES-JUNIOR et al., 2006).

Considerando os conhecimentos relacionados a esse tipo de encefalopatia, várias características podem ser observadas como, por exemplo, falha da microcirculação que precede alterações nas respostas de potenciais evocados, alteração na barreira hematoencefálica, afetando a expressão de moléculas intercelulares levando a disfunção mitocondrial (PYTEL e ALEXANDER, 2009).

Se pode ser considerada uma sequela comum em UTIs e a sua gravidade está correlacionada com a mortalidade que é induzida pela resposta inflamatória sistêmica (STRECK et al., 2008), uma melhor compreensão desse quadro nos permitirá definir estratégias terapêuticas mais eficazes que irão melhorar as funções neurológicas e sobrevida dos pacientes. As mais recentes descobertas envolvendo a participação dos receptores adenosinérgicos podem, provavelmente, ser alvos importantes para futuros investimentos farmacêuticos na abordagem aqui apresentada.

1.2 Papel do sistema adenosinérgico nas condições fisiológicas

A adenosina é um nucleosídeo de purina que compreende uma molécula de adenina ligada a uma porção de açúcar ribose, por meio de ligações glicosídicas, sendo um importante regulador em todo o corpo (JOHN et al., 2012). Estando presentes no meio extracelular, este mediador desempenha um papel em muitos processos bioquímicos, além de proteger as células e tecidos, quando eles passam por danos imunológicos (GETTYS et al., 2013; LONGHI et al., 2013).

Sob condições fisiológicas normais, os níveis de adenosina no microambiente do tecido são baixos e certamente inferiores ao limiar de sensibilidade das células do sistema imunológico. No entanto, durante a hipóxia, isquemia, inflamação, infecção, estresse metabólico e transformação tecidual tumoral, esses níveis podem aumentar rapidamente, alterando os tecidos. Diante disso, sinais de dupla função de sinalização de lesão tecidual em uma forma autócrina e parácrina são observados, provocando uma série de respostas teciduais que podem ajudar na proteção dos órgãos (LONGHI et al., 2013).

Dessa forma, a adenosina desempenha duas funções importantes: como mensageiro intracelular homeostático em todas as células, e como um neuromodulador controlando a liberação de neurotransmissores e a excitabilidade neuronal (SHEN et al., 2009). Portanto, os mecanismos envolvidos na geração de adenosina, são de considerável interesse terapêutico bem como as suas vias de sinalização (KUMAR, 2013).

Acredita-se que a adenosina desempenha um papel importante em várias doenças, por meio de dois processos, um com a enzima fosfatase alcalina e com o seu duplo modo de ação, no qual o maior destaque foi gerado para a fosfatase alcalina, que é capaz de reduzir conseqüentemente a inflamação, por meio da desfosforilação da endotoxina lipopolissacarídeo (LPS), que é um importante mediador da septicemia (ESTHER et al., 2014).

O ATP liberado durante o estresse celular causado pela inflamação e hipóxia também tem efeitos prejudiciais, mas pode ser convertido pela fosfatase

alcalina para adenosina com efeitos anti-inflamatórios e teciduais protetores (ESTHER et al., 2014). Enquanto as pesquisas iniciais apontam para o papel da adenosina como um metabólito do ATP e de adenosina monofosfatocíclico (AMPc), a sua importância é agora amplamente reconhecida como um modulador da neurotransmissão e comportamentos complexos (LONGHI et al., 2013).

Todos os efeitos de adenosina compreendem um grupo de receptores acoplados à proteína G que medeiam suas ações fisiológicas e biológicas. Atualmente, quatro subtipos foram clonados e identificados em diferentes tecidos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_{3A} . Suas características bioquímicas e cascatas de sinalizações estão associadas a cada receptor ao qual se ligam, fornecendo informações sobre como eles são regulados em resposta a ações agonistas, exercendo grande afinidade (A_1 , A_{2A}) e pequena afinidade (A_{2B} , A_{3A}) pela adenosina, com distribuição diferencial no cérebro, localizações distintas, vias de transdução de sinal e diferentes meios de regulação após a exposição aos agonistas (ARAB et al., 2013; SHETH et al., 2014).

Ocorrendo uma interação cada vez mais complexa entre os membros da família de receptores de adenosina e sua ampla distribuição e funções com outros grupos de receptores, a adenosina produz geralmente efeitos favoráveis nas suas atividades, como, por exemplo, melhoria do equilíbrio entre a utilização da energia e da oferta do miocárdio, limitando a lesão e remodelação adversa, suprimindo a inflamação (JOHN et al., 2012).

Estes receptores acoplados à proteína G mediam respostas variadas no corpo como modulação de fluxo coronário, frequência cardíaca e contração, cardioproteção, regulação inflamatória e controle do crescimento celular e remodelação do tecido (JOHN et al., 2012). Embora esteja constitutivamente presente no sistema biológico extracelular em concentrações muito baixas (<1M), ela aumenta sob condições estressantes (inflamação, por exemplo), no qual o nível de adenosina no plasma sobe para 4-10M (RIBEIRO e SEBASTIÃO, 2010).

O potencial da farmacoterapia adenosinérgica pode ser plenamente realizada com base na maior compreensão dos papéis dos receptores de adenosina em condições fisiológicas e patológicas, com foco na capacidade do

seu sistema receptor para regular a função celular, interferindo nos alvos estressores, e mediando respostas adaptativas de longo prazo (JOHN et al., 2012).

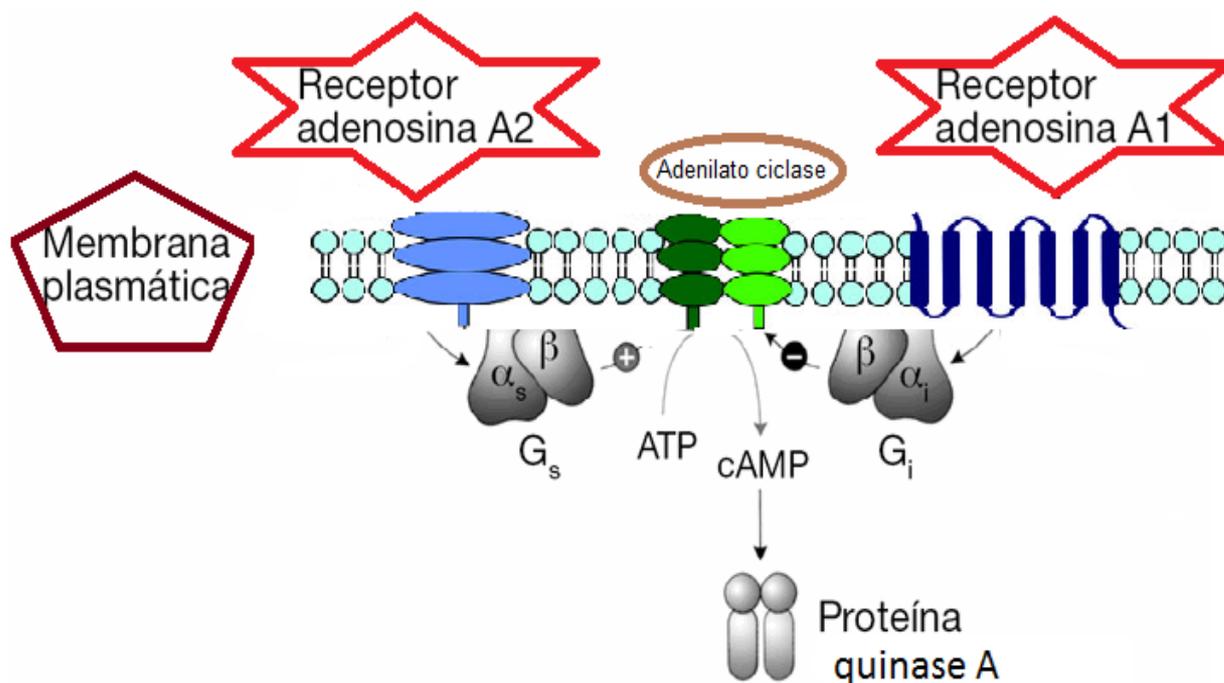


Figura 2 – Esquema da regulação dos receptores adenosinérgicos A_{2A} acoplados a proteína G_s, estimulando a enzima adenilato ciclase na produção de AMPc e ativação da proteína quinase A. Os receptores A₁ são acoplados a proteína G_i, que inibem a sinalização dependente de AMPc (Adaptado de BOISON, 2011).

Quando os níveis de adenosina aumentam diante do estresse, seus alvos apresentam interações com vários outros receptores e segundos mensageiros intracelulares, cujas respostas podem variar conforme os subtipos de receptores adenosinérgicos que, tradicionalmente, são classificados de acordo com o seu acoplamento diferencial na adenilato ciclase para regular os níveis de AMPc (SHETH et al., 2014).

Os receptores A₁ e A_{3A} são acoplados a proteínas G_i, enquanto os receptores adenosinérgicos A_{2A} e A_{2B} são acoplados a proteínas G_s. Os receptores A₁ são amplamente distribuídos por todo o cérebro e têm níveis elevados no hipocampo, córtex cerebral, cerebelo, núcleos hipotalâmicos, astrócitos, oligodendrócitos e microglia, estimulando a liberação de diversos

neurotransmissores em regiões sinápticas, tais como o glutamato, dopamina, acetilcolina e serotonina, resultando em aumento da excitação, vigília e atenção (SHETH et al., 2014).

Os receptores A_{2A} com localização mais restritiva no estriado estão presentes em bulbo olfatório, neurônios, microglia, oligodendrócitos, possivelmente astrócitos, espinhas dendríticas, regiões pós-sinápticas dos gânglios basais e em regiões pré-sinápticas no hipocampo, onde modulam a liberação de neurotransmissores, tais como o glutamato, a acetilcolina e noradrenalina. Em níveis moleculares, os receptores A_{2A} mostraram por interagir com outros tipos de receptores, incluindo os de dopamina D_2 , de adenosina A_1 , de canabinóides CB_1 , de glutamato metabotrópico subtipo-5 e nicotínico de acetilcolina, ampliando o leque de possibilidades utilizadas pela adenosina para interferir com a comunicação da função neuronal (SHETH et al., 2014).

Com isso, a ativação desses receptores também modula a excitabilidade neuronal e plasticidade sináptica, estando no centro de uma rede neuromoduladora que afeta uma gama de funções neuropsiquiátricas por interagir com vários sistemas de neurotransmissores e integrá-los, especialmente aos sistemas de via de neurotransmissão dopaminérgica e a glutamatérgica, as quais suas integrações ocorrerem em vários níveis afetando diversos tipos de comportamentos, como a atividade locomotora, o ciclo vigília-sono, ansiedade, depressão, aprendizagem e memória (CHEN e CHERN, 2011; SHEN et al., 2009).

Os receptores de adenosina A_{2B} exibem uma baixa afinidade para o agonista endógeno em comparação com os subtipos A_1 , A_{2A} e A_{3A} . Estes receptores são expressos no trato gastrointestinal, bexiga, pulmão, mastócitos, olho, tecido adiposo, cérebro, rins, fígado e outros tecidos, sendo encontrados em níveis baixos em células neuronais e gliais, tais como microglia e astrócitos (SHETH et al., 2014; TRINCAVELLI et al., 2014).

Os receptores de adenosina A_3 , por sua vez estão presentes em níveis baixos no hipocampo, córtex, cerebelo, estriado, astrócitos e microglia, sendo alvos promissores de drogas para uma série de doenças e, atualmente, várias pesquisas têm procurado desenvolver agonistas e antagonistas seletivos desses

receptores, porém seu papel fisiológico merece ser mais investigado (DAL-BEN et al., 2014).

A sincronização neuronal anormal é um dos aspectos centrais da fisiopatologia de doenças neurológicas. A adenosina parece estar envolvida na homeostasia cerebral e tem um papel ainda não totalmente esclarecido em várias doenças psiquiátricas (CHEN e CHERN, 2011; FERRE, 2009). Apesar disso, muitas terapias à base desse neurotransmissor, estão evoluindo rapidamente em estudos pré-clínicos e clínicos para o tratamento de doenças neurológicas (ARAB et al., 2013).

Nos últimos anos, a cafeína, um antagonista dos receptores de adenosina, que faz parte da família das metilxantinas (1,3,7- trimetilxantinas), passou a ser um alvo para muitas investigações em vários campos da ciência, isto porque é uma das substâncias psicoativas mais ingeridas no mundo, encontrada em mais 60 espécies vegetais, (FISONE et al., 2004; VERMA et al., 2013). A sua popularidade é atribuída aos seus benefícios perceptíveis pela forte atuação estimulatória no organismo, interferindo no humor e nos desempenhos cognitivo, psicomotor e fisiológico (HECKMAN et al., 2013). Dessa forma, é importante se considerar maiores informações sobre os alvos de ação dessa substância e possíveis contribuições que poderá exercer na pesquisa em questão.

1.3 Interferência da cafeína no sistema adenosinérgico

A cafeína é uma das drogas psicoestimulantes mais consumida no mundo. Sua aplicabilidade é conhecida pela associação de sua ingestão em afetar alguns dos processos humanos básicos e fundamentais no organismo, como o sono, estados de excitação, aprendizagem e memória. Funciona como um bloqueador não seletivo dos receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_{3A}) e tem sido relacionada com regulação da frequência cardíaca, a contração/relaxamento dos músculos cardíacos e lisos, e sinalização neural (FISONE et al., 2004; RIVERA-OLIVER e DÍAZ-RIOS, 2014).

Desde o final da década de 1990, estudos que utilizam os antagonistas dos receptores de adenosina, como a cafeína, para bloquear seus receptores, voltados para os subtipos A_1 e A_{2A} têm mostrado sinalização para reduzir os danos físicos, celulares e moleculares causadas por uma lesão medular bem como um acidente vascular cerebral (infarto cerebral) e outras doenças neurodegenerativas, tais como as doenças de Parkinson e Alzheimer, por exemplo. Outros estudos utilizando agonistas do receptor de adenosina, também têm demonstrado proporcionar um efeito neuroprotetor em diferentes modelos de doenças neurodegenerativas por meio da redução da liberação de neurotransmissor excitatório, apoptose e respostas inflamatórias, entre outros (RIVERA-OLIVER e DÍAZ-RIOS, 2014).

Este psicoestimulante tem perfil farmacocinético e farmacodinâmico bem compreendidos (HECKMAN et al., 2013). As suas formas de administração podem ser realizadas por vias oral, intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular. Após o consumo oral, a cafeína é rapidamente, e quase que completamente, absorvida pelo trato gastrointestinal, atingindo níveis de picos plasmáticos em cerca de 30 minutos após o consumo, com um tempo de $\frac{1}{2}$ de eliminação variando de 2,5 a 10 horas (MAGKOS e KAVOURAS, 2005). É rapidamente distribuído no corpo e encéfalo, sendo metabolizado no fígado, enquanto que uma pequena fração (menos de 5% da dose ingerida) é excretada de forma não alterada na urina (KUMAR, 2013).

Uma substância psicoativa, cuja presença está em diversos componentes de alimentos, com a grande maioria das contribuições alimentares provenientes do consumo de bebidas, traz o café como um dos principais contribuintes para a ingestão de cafeína em quase todas as faixas etárias. Refrigerantes e chá proporcionaram uma maior porcentagem de cafeína nas faixas etárias mais jovens (<18 anos) (MITCHELL et al., 2014). O Brasil é o segundo maior consumidor global de café, atrás apenas dos EUA. No consumo por habitante, os líderes mundiais são Finlândia, Noruega e Dinamarca (HECKMAN et al., 2013).

Os brasileiros estão consumindo mais xícaras de café por dia e diversificando as formas da bebida durante o dia, adicionando ao café filtrado consumido nos lares também os cafés expressos, cappuccinos e outras combinações com leite. O consumo de café no País, segundo a Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), deverá crescer até 3% em 2013, o que elevaria o consumo interno para cerca de 21 milhões de sacas (BEZERRA et al., 2013).

Dentre as formas comercializadas de cafeína, há o consumo diário na ingestão do café (ASCHERIO et al., 2011), que é um complexo químico constituído de mais de 1.000 diferentes compostos, incluindo a cafeína. Devido à presença desses compostos fitoquímicos, o café possui alta atividade como antioxidante medido pelos ensaios de capacidade de observância dos radicais de oxigênio, com alto poder no combate aos radicais livres (CHU et al., 2009).

Mitchell et al. (2014) mostraram que 85% da população dos EUA consome por dia pelo menos uma bebida com cafeína. Os maiores consumidores estão entre as faixas etárias variando entre 50-64 anos (226 ± 2 mg/dia). A ingestão de 90% dessa substância foi de 380 mg/dia para todas as idades. Sua atuação também acontece nos componentes de muitas combinações de medicamentos comercializados para o alívio dos sintomas algícos (dores de cabeça, por exemplo) e relaxantes musculares (MARIN et al., 2011).

Apesar de alguns estudos relatarem que a cafeína seja considerada uma substância que pode produzir dependência (OGAWA e UEKI, 2010), quando administrada aguda e cronicamente, parece ter apenas pequenas consequências

negativas à saúde. Por esta razão, e porque poucos usuários relatam perda do controle sobre o seu consumo, as agências governamentais não impuseram restrições na sua ingestão diária (KILLER et al., 2014).

Outra observação que reforça o efeito da cafeína, além de sua atuação como antagonista dos receptores da adenosina A_1 e A_{2A} no SNC, é a inibição da enzima fosfodiesterase, responsável pela destruição do mediador químico intracelular denominado AMPc, levando ao seu aumento, fazendo com que seus efeitos melhorem o desempenho e resistência no ser humano, no entanto, seria necessária uma concentração 20 vezes maior para alcançar os seus efeitos (FRIEDMAN et al., 1998; WAKE et al., 2000). Para bloquear os receptores do ácido gama-amino-butírico A ($GABA_A$), a concentração deve ser 40 vezes maior; e para mobilizar o cálcio dos depósitos intracelulares são necessárias concentrações 100 vezes maiores (FREDHOLM et al., 2012).

A utilização aparentemente paradoxal de agonistas adenosina e antagonistas dos receptores de adenosina como agentes neuroprotetores foi atribuída a diferenças nos níveis de dosagem, o método de administração de fármaco, concentração extracelular de neurotransmissores excitatórios e estágio de progressão da doença (RIVERA-OLIVER e DÍAZ-RIOS, 2014). Os efeitos da cafeína normalmente são dependentes da dose, mas tipicamente bifásico, isto é, baixas doses são percebidas como prazerosas e estimulantes, enquanto que o efeito contrário é observado com altas doses (ARENDASH e CAO, 2010).

O uso agudo de cafeína tem atividade como neuroprotetor endógeno do cérebro após a infecção, assim evitando a morbidade (CLARK et al., 2010). Ela afeta a liberação de dopamina e vários outros neurotransmissores, incluindo a noradrenalina, acetilcolina, serotonina e glutamato (LONGHI et al., 2013). Pelo fato desses neurotransmissores estarem amplamente distribuídos por todo o cérebro, provavelmente eles sejam responsáveis pelo efeito estimulante da cafeína (FRARY et al., 2005).

Muitos indivíduos se adaptam ao consumo de cafeína em decorrência de sua própria tolerância, de tal forma que o habitual está em uma faixa entre os efeitos reforçadores e aversivos (FREDHOLM et al., 2012). Este psicoestimulante

afeta as funções do encéfalo, principalmente por conta de suas afinidades pelos receptores A_{2A} e, como consequência, exerce um papel na modulação dopaminérgica. O seu efeito antagonista dos receptores de adenosina pode também implicar em um mecanismo de ação dopaminérgico, tais como a liberação dos neurotransmissores como a serotonina e acetilcolina (FERRE, 2008; FERRE et al., 2008).

Os efeitos do café e da cafeína parece também proteger contra doenças neurodegenerativas, incluindo os seus alvos moleculares, modificações e adaptações neurofisiológicas, bem como potenciais mecanismos que determinam as ações neuroprotetoras e comportamentais. A cafeína preveniu a perda da coordenação motora bem como o surgimento do processo decorrente de quadro infeccioso associado à doença (TAN et al., 2013)

Outras conclusões apresentadas indicaram múltiplos efeitos benéficos dessa metilxantina para normalizar as funções cerebrais e prevenir sua neurodegeneração como, por exemplo, o modelo para o tratamento de Doença de Alzheimer (FERRE, 2010). O impacto positivo da cafeína na cognição identificou os receptores A_{2A} da adenosina como os principais alvos moleculares no processo de neuroproteção no tratamento dessa doença promovido diante do seu consumo (FERRE, 2010; TAN et al., 2013).

Dessa forma, considerando a abrangência de informações que medeiam as ações da cafeína no organismo, cabe melhor discorrer sobre os efeitos dela no SNC, com enfoque voltado mais para ansiedade, depressão e memória.

1.4 Efeitos do sistema adenosinérgico e cafeína no SNC

A adenosina está presente em todos os tecidos do organismo, modulando processos fisiológicos importantes e efeitos no SNC (POPOLI e PEPPONI, 2013). Vários trabalhos indicam que ela pode ser um agente neuroprotetor endógeno central, uma vez que previne o dano causado por isquemia e excitotoxicidade, advindo de influência dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} nos mecanismos neuroprotetores (MITCHELL et al., 2014; NELSON et al., 2014).

Esse mediador químico está envolvido nos processos de comportamento, tais como função motora, ansiedade, depressão, recompensa e dependência de drogas ilícitas, também em doenças humanas como, por exemplo, outras doenças neurodegenerativas: Parkinson, a esquizofrenia e a demência, desempenhando um papel importante em perturbações afetivas (MUSTARD, 2013). As evidências clínicas e experimentais mostraram que a atividade adenosinérgica também está envolvida na mania bipolar, distúrbios de pânico e comportamento agressivo (CASTRO et al., 2012).

Doenças neurodegenerativas são algumas das mais temidas enfermidades na sociedade moderna, sem tratamentos eficazes para retardar ou parar esta neurodegeneração. Várias décadas, após a primeira tentativa de tratar a doença de Parkinson usando cafeína, trouxe enorme quantidade de informações sobre o seu potencial efeito benéfico, bem como medicamentos de adenosina sobre as principais doenças neurodegenerativas (CHEN e CHERN, 2011).

Assim, no que diz respeito a doenças neurodegenerativas, esses potenciais benefícios das metilxantinas, como a cafeína por exemplo, contrapõem alguns médicos que desencorajam o consumo regular de cafeína na população com idades mais avançadas. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares pelos quais a cafeína está fornecendo esta neuroproteção (CHEN e CHERN, 2011; MUSTARD, 2013).

As investigações clínicas, farmacológicas e modelos de roedores também têm avaliado os receptores de adenosina em vários tipos de ansiedade, cujas

respostas têm sido parcialmente atribuídas aos receptores A_1 ou A_2 (BERRENDERO et al., 2003; BILBAO et al., 2006; MUSTARD, 2013). Escudeiro et al. (2013), por exemplo, realizaram um estudo em camundongos em que compararam o efeito da adenosina com o da cafeína, teofilina e as suas combinações. Os animais foram avaliados nos testes de labirinto zero e labirinto em cruz elevado (LCE) para comparar diferentes parâmetros a ansiedade. A adenosina mostrou efeito ansiolítico em todas as doses administradas (10, 25, 50 e 100 mg/kg), ao passo que a cafeína (8, 15, 30 e 60 mg/kg) e a teofilina (30 e 60 mg/kg) mostraram ação psicoestimulatórias em doses mais baixas e efeitos ansiogênicos em doses altas. O estudo sugeriu o envolvimento do receptor adenosinérgico em comportamentos relacionados a ansiedade.

Além dos aspectos relacionados à ansiedade, a depressão também merece atenção, segundo a OMS, 121 milhões de pessoas sofrem de depressão em todo o mundo, de tal forma que o Brasil ocupa o primeiro lugar no *ranking* da prevalência da doença entre os países em desenvolvimento, não deixando marcas aparentes, pois é impossível de ser diagnosticada por exames de imagem e, além de ser confundida como uma tristeza normal, os seus sintomas podem passar despercebidos. Diante desse panorama, a depressão é a quarta principal causa de incapacitação em todo o mundo e, de acordo com projeções da OMS, em 2030 ela será o mal mais prevalente do planeta, a frente da neoplasia maligna e de algumas doenças infecciosas (WHO, 2013).

A depressão também parece ser influenciada pelos mesmos sistemas de receptores (CASTRO et al., 2012). Esta é uma doença séria e recorrente que afeta cerca de 17-20% da população mundial, podendo também resultar em morte prematura, com maiores consequências econômicas e sociais (KESSLER et al., 1994). O teste do Nado forçado é um modelo experimental usado para avaliar comportamento sugestivo de depressão em roedores de pequeno porte, podendo ser caracterizado pela anedonia (perda de interesse ou prazer), mudanças nos eixos hipotálamo-hipófise-suprarenal, alterações no peso do corpo e glândulas adrenais (HARRO et al., 2011). Todos estes sintomas são consistentes com a depressão humana e podem ser tratados com antidepressivos (PERRY et al., 2014).

Além disso, vários estudos têm demonstrado que os sobreviventes a sepse apresentam comprometimento cognitivo a longos prazos, incluindo alterações na memória, atenção, concentração e/ou perda global de função cognitiva. No entanto, a patogênese e história natural da encefalopatia séptica e disfunção cognitiva são ainda pouco conhecidas e melhor compreensão destes processos é necessário para o desenvolvimento de intervenções preventivas e terapêuticas eficazes (STRECK et al., 2008).

Os sistemas pelos quais a cafeína modula a atividade do cérebro via os receptores de adenosina podem, provavelmente, se constituir em alvos promissores de investimentos envolvendo novas terapias farmacológicas que possibilitarão uma melhor qualidade de vida dos pacientes sépticos. Diante disso, nossa proposta é avaliar os efeitos dessa metilxantina nas sequelas comportamentais e cognitivas decorrentes de uma provável encefalopatia séptica.

2.0 *OBJETIVOS*

2.1 Geral

Avaliar os efeitos comportamentais e cognitivos da cafeína em ratos sobreviventes à sepse experimental.

2.2 Específicos:

- Observar os parâmetros comportamentais relacionados à locomoção, ansiedade e depressão de ratos que passaram por procedimentos cirúrgicos com e sem processo inflamatório sistêmico;
- Avaliar as alterações cognitivas dos ratos nas mesmas condições experimentais;
- Investigar as propriedades da cafeína nas alterações de comportamentais e déficits cognitivos decorrentes das condições cirúrgicas com e sem processos inflamatórios sistêmicos.

3. *M*ATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos testes experimentais foram utilizados ratos Wistar machos (n=80), com 2,5 meses, média de 300g, provenientes do Biotério da Faculdade Sena Aires (Valparaíso de Goiás-GO) e mantidos durante o período de uma semana para habituação no Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina/UnB. Os animais foram alojados em grupos de dez por caixa, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura ambiente, com água e ração *ad libitum*.

Todos os critérios da pesquisa estiveram de acordo com as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (protocolo 33880/2009), conforme comprovante anexado na página 86.

3.2 Drogas e soluções

A cafeína - CAF (Sigma), foi administrada na dose de 10 mg/kg por via oral (v.o.) diluída em solução fisiológica (0,9%). O anestésico ketamina (80 mg/kg) e o relaxante muscular xilazina (10 mg/kg), usados para a sedação dos animais, foram provenientes da Syntec, administrados por via intraperitoneal (i.p.) em associação, sem qualquer diluição prévia. Os antibióticos clindamicina (25 mg/kg) e gentamicina (3 mg/Kg) foram obtidos do Laboratório EMS, sendo diluídos em solução fisiológica (0,9%) e administrados também por via i.p. durante uma semana pós procedimentos cirúrgicos.

As doses consideradas no presente estudo estão de acordo com pesquisas prévias realizadas por nosso grupo de trabalho (LEITE et al., 2013) e informações literárias provenientes de artigos científicos indexados internacionalmente (BARICHELLO et al., 2005, 2007; COMIM et al., 2011a, 2011b).

3.3 Cirurgia de Ligadura e Perfuração Cecal (CLPC)

Após serem anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via i.p., os animais passaram pelos procedimentos demonstrados na Figura 3. Foi feita a tricotomia na parte ventral dos animais, seguida da incisão central de aproximadamente 2 cm, para a exposição do ceco e obstrução (ligadura parcial) no segmento distal próximo da válvula ileocecal. O ceco foi perfurado com agulha 14G na borda antimesentérica. Após a verificação da saída de fezes do ceco, essa estrutura foi retornada à cavidade abdominal. A incisão cirúrgica foi fechada em 2 planos de sutura fáschia e músculos abdominais com poliéster 4 (0) em pontos contínuos. No final dos procedimentos, foi administrado um volume de 3 mL de solução salina, via subcutânea (s.c.), como líquido de reanimação. Os animais controles (Operação Fictícia-OF) passaram por todas as etapas cirúrgicas, porém sem perfuração do ceco e ligadura (LEITE et al., 2013).

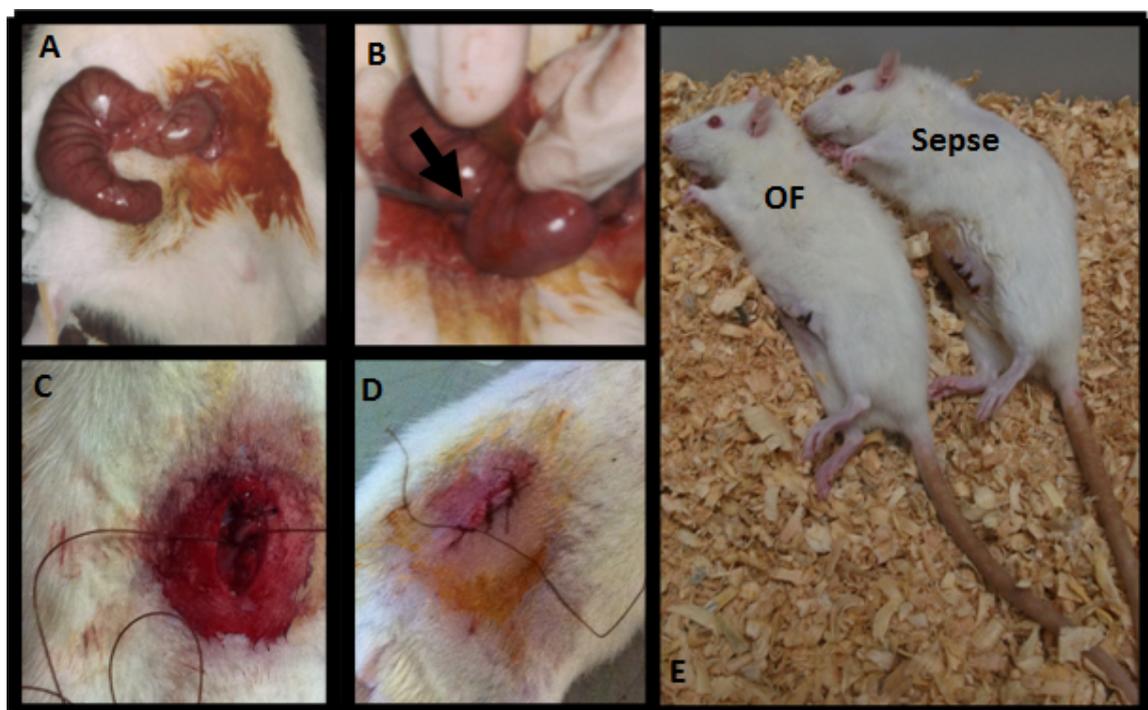


Figura 3 - Cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLPC). A= Incisão central no ventre do rato e exposição do ceco, B= A seta representa o local de ligadura com posterior perfuração do ceco e liberação das fezes. C= Inserção do órgão perfurado na cavidade abdominal, seguida de sutura interna e externa, D= Incisão cirúrgica suturada, E= animais em recuperação cirúrgica. OF= Operação fictícia.

Foram realizados dois regimes de tratamento: 1) subcrônico: uma semana antes e uma semana após os procedimentos cirúrgicos, e 2) agudo: uma semana pós-procedimentos cirúrgicos. Os animais foram divididos em grupos, conforme demonstrado abaixo. Após uma hora da última administração da CAF, os animais foram avaliados em diferentes modelos experimentais, conforme o tipo de avaliação comportamental ou cognitiva.

Quadro 1 – Especificação dos grupos dos animais usados no procedimento experimental por cada regime de tratamento

Grupos	Tratamentos		n*
1	OF	SAL	10
2	OF	CAF	10
3	Sepse	SAL	10
4	Sepse	CAF	10

* n total=80 (considerando 2 regimes de tratamentos)

3.4 Modelos experimentais

3.4.1 Teste do Campo Aberto

Aparato: Arena em madeira (60x60x35cm), com o chão dividido em nove quadrantes de 20x20 cm (Figura 4).

Fundamento: A avaliação neste teste é um procedimento que tem a finalidade de se observar a locomoção de animais de pequeno porte. Em um primeiro momento, sabe-se que ratos, assim como os seres humanos, podem reagir ao ambiente considerado “novo” e apresentar uma resposta aversiva, característica de congelamento (do inglês *freezing*), que é um comportamento típico que, muitas vezes, os animais usam como forma de diminuir as detecções auditivas por parte dos predadores. No entanto, em um segundo momento, ele tende a explorar o ambiente onde se encontra (LUCENA et al., 2010).



Figura 4 – Teste do Campo aberto dividido em 9 quadrantes para avaliar a atividade locomotora dos ratos. Inicialmente, o animal é posicionado no centro da arena para, posteriormente, explorar o equipamento durante 5 min.

Procedimento experimental: Antes do início dos experimentos, os animais foram levados ao laboratório por um período de, no mínimo, uma hora, para aclimação e habituação ao ambiente do teste. A atividade locomotora foi considerada quando o animal atravessava um dos quadrantes do campo aberto com as quatro patas. Cada animal foi testado por um período de 5 min. Todos os experimentos foram conduzidos entre 08:00 e 12:00 h, com o objetivo de evitar a influência de variações circadianas, que poderiam interferir com os resultados experimentais.

3.4.2 Teste do Labirinto em cruz elevado (LCE)

Aparato: Equipamento em madeira, na forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços fechados (50x10x40cm) e dois abertos (50x10cm), opostos entre si (HANDLEY e MITHANI, 1984). Uma proteção de acrílico transparente de 1 cm de altura circundava os braços abertos com o objetivo de impedir a queda dos animais do LCE (Figura 5).

Fundamento: O LCE é baseado na aversão natural que roedores apresentam pelos braços abertos do labirinto (CRUZ et al., 1994; MONTGOMERY, 1955).

Quando são forçados a permanecerem nesses braços mostram manifestações fisiológicas e comportamentais de medo, tais como congelamento, defecação e aumento nos níveis de corticosteróides plasmáticos (PELLOW et al., 1985). Como consequência, eles permanecem um tempo maior nos braços fechados.

Estudos de Treit et al. (1993) indicaram que o fator de maior contribuição para esta “reação de medo” era a falta das paredes altas nos braços abertos, que impedia a tigmotaxia. A proporção da exploração total nos braços abertos determinava uma medida de ansiedade, de tal modo que o aumento nas porcentagens de tempo e de entradas nos braços abertos era considerado como indicativo de ação ansiolítica de drogas (HANDLEY e MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985).

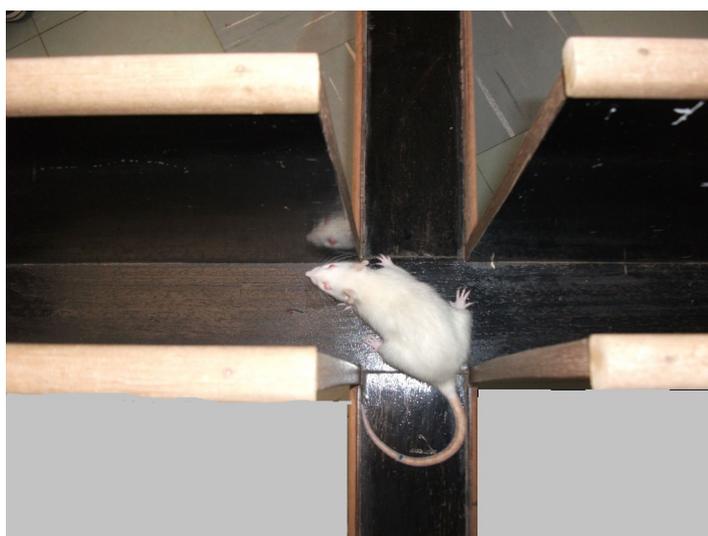


Figura 5 – Teste do Labirinto em cruz elevado utilizado para se avaliar a resposta ansiolítica ou ansiogênica das substâncias administradas nos ratos. O animal é sempre colocado no centro do labirinto para ter a escolha de explorar os braços abertos ou fechados durante um período de 5 min.

Procedimento experimental: Cada rato foi posicionado no centro do LCE, com a face voltada para um dos braços fechados e colocado para explorar o equipamento por 5 min. O pesquisador fez as anotações do número de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (EBA e TBA, respectivamente) e o número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços fechados (EBF e TBF, respectivamente). As porcentagens de EBA (%EBA) foram calculadas em relação ao número total de entradas nos dois

braços e ao tempo de exploração nesses braços em relação ao tempo total do experimento. Essas porcentagens (%) da EBA e TBA foram calculadas de acordo com as fórmulas: $(EBA/EBA+EBF) \times 100$ e $(TBA/TBA+TBF) \times 100$, respectivamente (PELLOW et al., 1985). O efeito ansiolítico ou ansiogênico foi definido pelo aumento ou diminuição, respectivamente, na proporção das EBA, relativo ao número total de entradas em ambos os braços, e no tempo de exploração naqueles braços, relativo ao tempo total experimental.

3.4.3. Teste do Nado forçado

Aparato: Neste teste, os animais foram colocados em um cilindro Plexiglass (30 cm de diâmetro e 50 cm de altura), contendo 40 cm de volume de água a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 min (PORSOLT et al., 1977) (Figura 6).

Procedimentos experimentais: Os ratos exibiram dois tipos de comportamentos em um tempo de 5 min: *fuga*, que foi observada nos primeiros dois minutos; e *imobilidade contínua* nos três últimos minutos (permanecer flutuando, mantendo somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água). Os dois minutos iniciais (fuga) foram considerados para habituação ao teste. O tempo da imobilidade foi definido como indicativo de comportamento sugestivo de depressão (CRYAN et al., 2002; KIRBY e LUCKI, 1998).



Figura 6: Aparato utilizado para o Teste do Nado forçado, realizado em um tempo total de 5 min, onde os 2 primeiros minutos são considerados para habituação.

3.4.4 Esquiva inibitória do tipo *step-down*

Aparato: O aparelho de esquiva (EP-104 INSIGHT) consiste em uma caixa de vidro e metal medindo 50 x 25 x 25 cm com uma plataforma de 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm comprimento. No canto esquerdo apresenta uma série de barras de alumínio, distribuídas com uma distância de 1 cm entre si, que constitui o assoalho da caixa, conectadas a um estimulador elétrico (Figura 7).

Fundamento: A medida da latência avaliada no teste da esquiva inibitória do tipo *step-down* tem sido um dos modelos experimentais usado por muitos laboratórios na avaliação dos estudos envolvendo aprendizagem e memória (CASTRO et al., 2012; MAIA et al., 2009). Para tal, os parâmetros de avaliação envolvem uma fase de treino e pós-treino e um choque de baixa intensidade, que serve de estímulo aversivo para que o animal deixe de executar uma determinada tarefa que foi a ele apresentada. Esse procedimento deve ser lembrado quando da realização de um teste proposto, como mecanismo de retenção da memória.

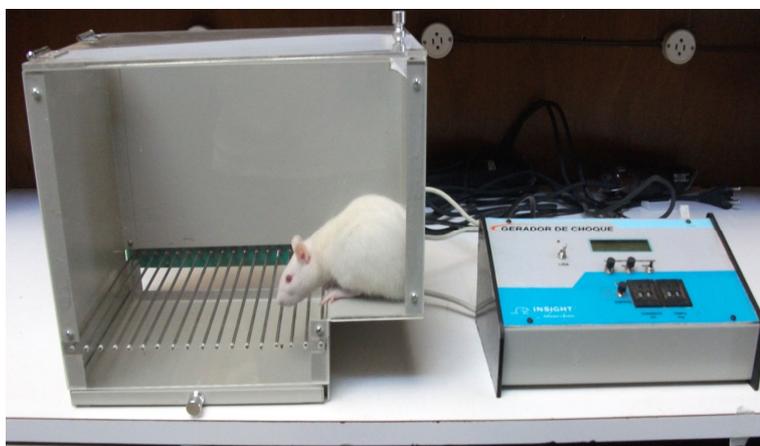


Figura 7 – Esquiva inibitória do tipo *step-down* usada para avaliar a memória de curta e longa duração em rato durante um período de 3 min.

Procedimento experimental: As etapas apresentadas a seguir são padronizadas na área de investigação de memória para este teste específico.

- No primeiro dia da análise, os animais foram habituados ao aparato, permanecendo no interior do mesmo por 3 min.

- No segundo dia, os animais foram cuidadosamente colocados na plataforma em frente ao canto esquerdo da caixa de treino, com a face virada para o lado oposto ao do observador. Assim que o animal desceu da plataforma e colocou as quatro patas na grade recebeu um choque de 0,4 mA por 1 seg, sendo retirado imediatamente da caixa de treino. A memória de curta duração (MCD) foi investigada 1 h após o treino. No teste, o tempo (latência) máximo de 3 min (180 seg) em que os animais levaram para descer com as quatro patas da plataforma foi utilizado como indicativo de retenção de memória.
- No terceiro dia, os animais foram novamente colocados cuidadosamente na plataforma em frente ao canto esquerdo da caixa de treino. A memória de longa duração (MLD) foi avaliada 24h após o treino. Da mesma forma que na MCD, o tempo (latência) máximo de 3 min (180 seg) em que os animais levaram para descer com as quatro patas da plataforma foi utilizado como indicativo de retenção de memória.

Após observar cada animal nos testes, os aparatos foram limpos com álcool 10% (v/v) para evitar que o odor do rato recém-testado interferisse no comportamento dos demais que seriam avaliados.

3.4.5 Teste de Reconhecimento social

Aparato: Caixas plásticas de acondicionamento de ratos, onde os mesmos foram habituados (Figura 8).

Fundamento: O teste de Reconhecimento social foi padronizado por Dantzer et al. (1987) para avaliar memória social de curto prazo, consistindo de duas apresentações sucessivas (5 min cada), separadas por um curto período de tempo onde o rato jovem (25-30 dias de nascimento), é colocado na caixa de um rato adulto, ambos do mesmo sexo. Para se avaliar um possível efeito facilitador da memória, na primeira exposição o rato jovem é exposto ao rato adulto 1 hora depois da administração das substâncias. Durante as exposições, é cronometrado o tempo em que o rato adulto leva para explorar/investigar o rato jovem (cheirar,

lamber ou comportamento decorrente de qualquer tipo de aproximação). No final da primeira exposição, o rato jovem é recolocado na sua caixa específica e reexposto ao mesmo animal, 2 horas depois.

O intervalo de 2 horas é usado como uma espécie de janela temporal para testar substâncias que melhoram a memória. O que geralmente é aceito nesse tipo de teste é que se o período no qual o animal foi avaliado for menor do que 40 min, o rato adulto exibirá reconhecimento do rato jovem, o que será indicado por uma redução significativa no tempo de investigação social, durante a segunda avaliação (DANTZER et al., 1987; PREDIGER et al., 2005). Entretanto, quando o mesmo animal jovem for reexposto por um período mais longo (mais que 1 hora) após a primeira apresentação, o rato adulto demorará muito mais tempo para reconhecer o rato jovem, isto é, o tempo de investigação social na segunda apresentação será similar aquele observado na primeira avaliação.



Figura 8 – Caixa de acondicionamento para avaliação da memória de curto prazo de ratos no Teste de Reconhecimento social por um período de 5 min.

Procedimentos experimentais: Para essa avaliação foram utilizados ratos operados (adultos), e ratos com 25-30 dias (jovens), sendo que esses últimos serviram somente de estímulo social para os primeiros. Os animais adultos foram mantidos isolados em caixas plásticas durante 24 horas (42x34x17cm). Os ratos jovens foram isolados somente 20 minutos antes de começar os experimentos. Após esse período de tempo, cada rato jovem foi colocado na caixa de um rato adulto, em um intervalo de 5 min, quando foi cronometrado o tempo em que o rato adulto levou para explorar/investigar o rato jovem, sendo que após esse

procedimento o jovem retornou à sua caixa e aguardou a próxima reexposição (após 2 horas da primeira exposição).

3.4.6 Resumo do Desenho experimental

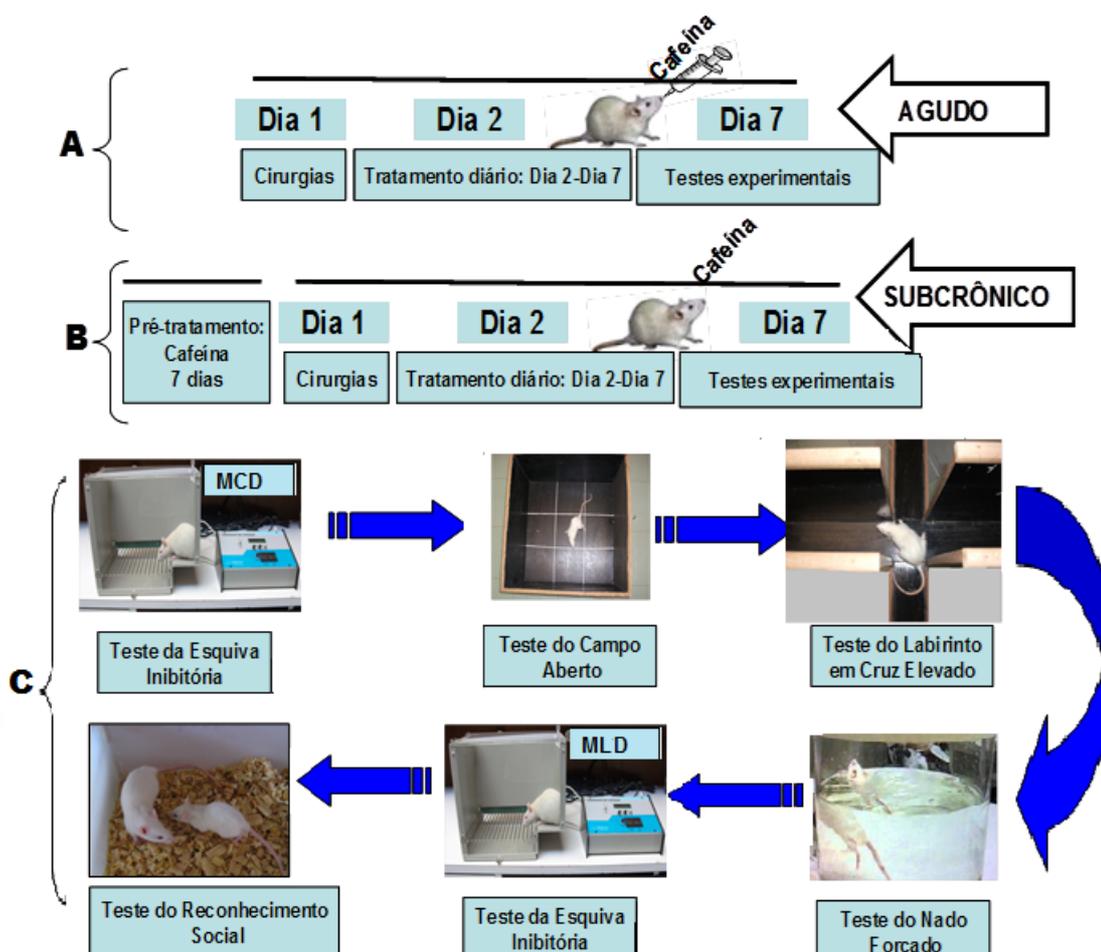


Figura 9 – Delineamento dos procedimentos experimentais. A) Administração da cafeína (10 mg/kg, v.o.) durante uma semana após os procedimentos cirúrgicos (tratamento agudo); B) A cafeína foi administrada durante uma semana antes dos procedimentos cirúrgicos e continuado por mais uma semana pós-procedimentos cirúrgicos (tratamento subcrônico); C) Os testes experimentais foram realizados, de forma sequenciada: memória (Teste da Esquiva inibitória *step-down*- MCD), locomoção (Teste do Campo Aberto), ansiedade (Teste do Labirinto em cruz elevado), depressão (Teste do Nado forçado), memória (Teste da Esquiva inibitória *step-down*- MLD) e Teste do Reconhecimento social. As avaliações foram realizadas no último dia de tratamento, 1h após a última administração da cafeína.

3.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 10 animais por grupo. As comparações estatísticas foram realizadas pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via e os grupos comparados entre si pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade indicativa de diferença estatisticamente significativa foi de $p \leq 0,05$. Para os dados do tempo de latência no teste de esquiva inibitória foi realizada uma análise não paramétrica utilizando as medianas (e seus intervalos interquartis), analisadas pelo Kruskal-Walis seguido do *post hoc* de Dunn. Para tal, foi utilizado o software GraphPad Prism, v. 5.01®, 2010 (San Diego, CA).

4. *R*ESULTADOS

4.1 Teste do campo aberto

Neste teste, a locomoção dos animais foi avaliada considerando o número total de quadrantes percorridos em um período de 5 minutos. A cafeína não apresentou qualquer diferença estatística em relação aos controles tanto administrada com duas semanas [$F_{(3,39)}=1,406$; $p=0,2568$] quanto com uma semana [$F_{(3,39)}=2,735$; $p=0,0578$], conforme demonstrado na Figura 10.

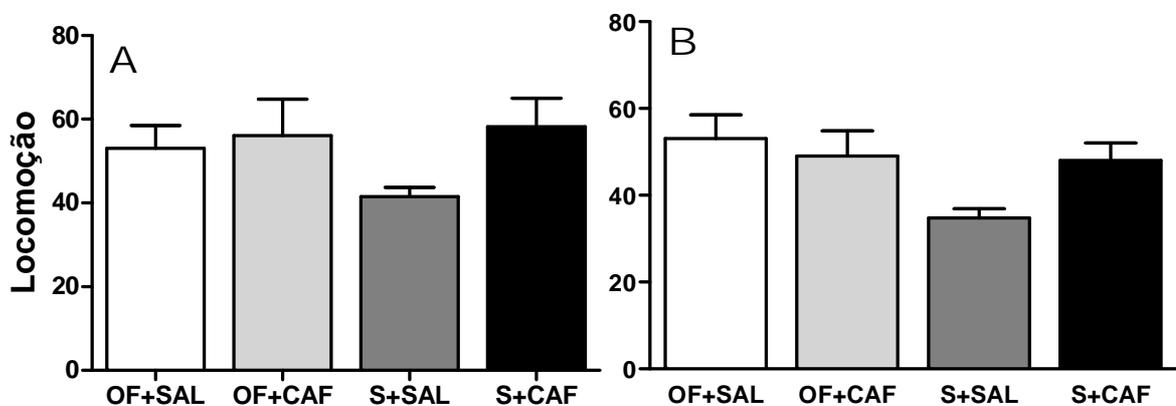


Figura 10: Efeitos da cafeína (10 mg/kg) administrada em ratos: A) Durante uma semana pré e uma semana pós-procedimentos cirúrgicos ou B) Uma semana pós-procedimentos cirúrgicos. O número de ambulações foi avaliado no teste do campo aberto por 5 min. Cada barra representa a média ± e.p.m de 10 animais por grupo (ANOVA, Teste de Newman Keuls). OF+SAL= Operação fictícia+Salina, OF+CAF= Operação fictícia+Cafeína, S+SAL= Sepse+Salina, S+CAF= Sepse+Cafeína.

4.2 Teste do LCE

No teste do LCE, os animais que sobreviveram à sepse apresentaram diferenças significantes em relação aos controles, tanto quando a cafeína foi administrada com duas semanas (% EBA [$F_{(3,39)}=9,728$; $p<0,0001$]; %TBA [$F_{(3,39)}=9,680$; $p<0,0001$]); ou com uma semana (% EBA [$F_{(3,39)}=5,805$; $p<0,0024$]; %TBA [$F_{(3,39)}=3,481$; $p=0,0256$]). Nenhuma alteração foi observada com duas ([$F_{(3,39)}=1,778$; $p<0,1689$]) ou uma semana ([$F_{(3,39)}=2,181$; $p=0,1071$]) de administração da cafeína, conforme demonstrado na Figura 11.

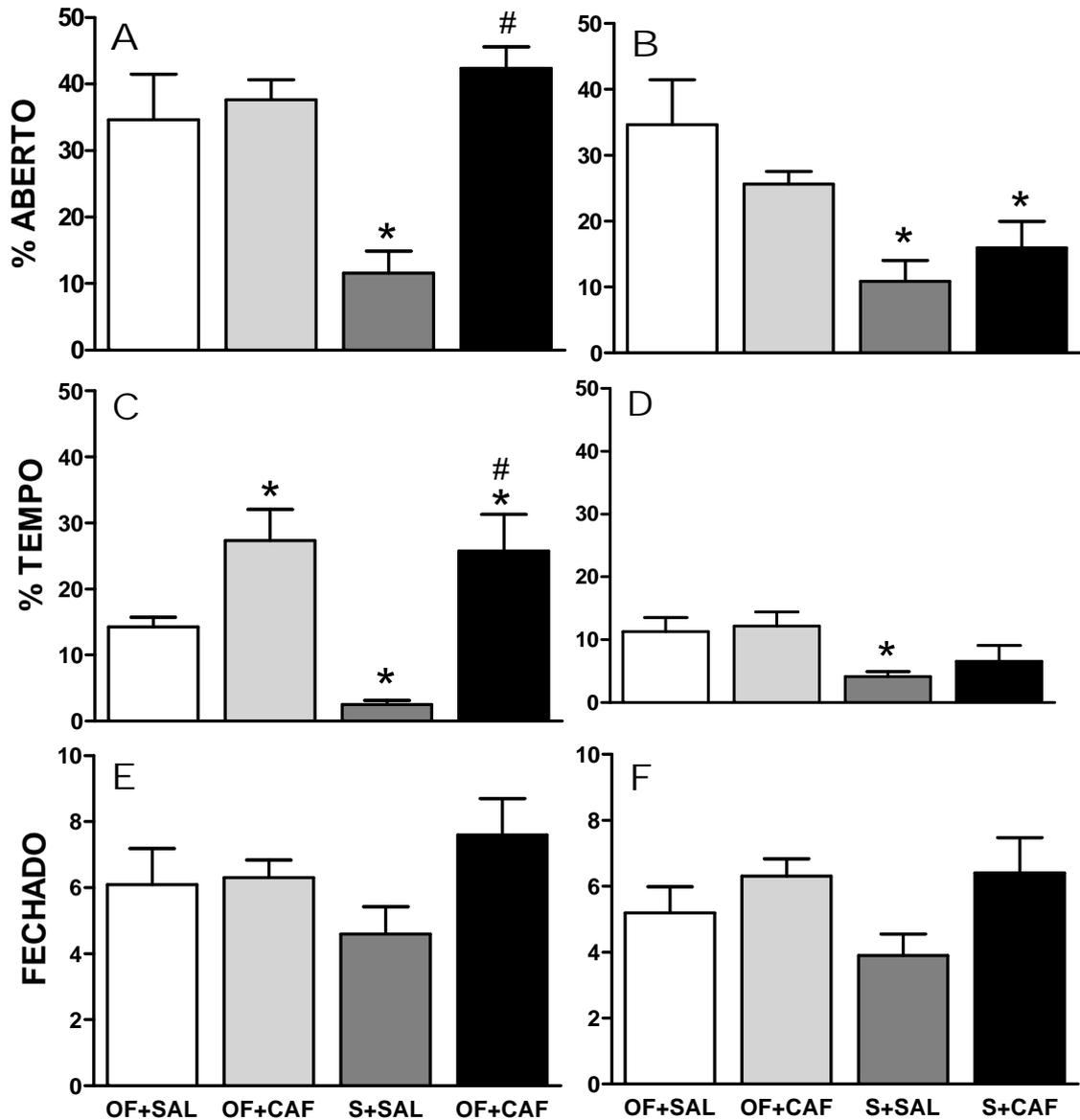


Figura 11: Efeitos da cafeína (10 mg/kg) no comportamento de ansiedade de ratos avaliados no teste do Labirinto em cruz elevado (LCE). Painéis à esquerda representam os resultados da cafeína administrada durante uma semana pré e uma semana pós-procedimentos cirúrgicos. Painéis à direita representam os resultados da cafeína administrada durante uma semana pós-procedimentos cirúrgicos. (A e B) representam a % de entradas dos animais nos braços abertos do LCE; (B e C) representam a % de tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE; (E e F) representam a frequência dos animais nos braços fechados. Cada barra representa a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo. * $p \leq 0,05$ representa diferença estatística em relação aos animais controles OF. # $p \leq 0,05$ representa diferença estatística em relação aos animais que sobreviveram à sepse (ANOVA, Teste de Newman Keuls). OF+SAL= Operação fictícia+Salina, OF+CAF= Operação fictícia+Cafeína, S+SAL= Sepse+Salina, S+CAF= Sepse+Cafeína.

4.3 Teste do nado forçado

Os animais foram avaliados quanto à sua capacidade de realizar os movimentos mínimos necessários para se manterem imóveis na água (Figura 12). A ANOVA de uma via detectou diferença estatística entre os grupos com duas ([F_(3,39)= 4,321; p=0,0106]) e uma semana ([F_(3,39)= 9,410; p<0,0001]) de administração da cafeína.

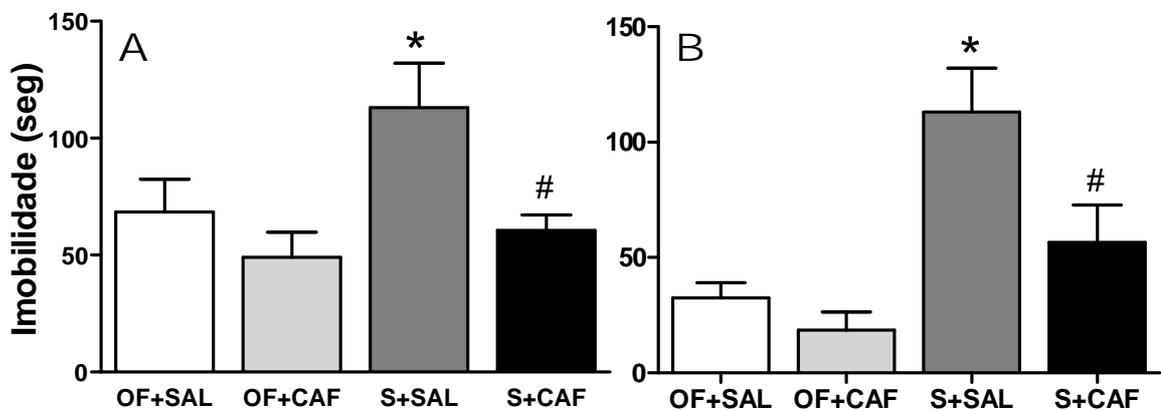


Figura 12: Efeitos da Cafeína (10 mg/kg) administrada em ratos: A) Durante uma semana pré e uma semana pós-procedimentos cirúrgicos ou B) Uma semana pós-procedimentos cirúrgicos. O tempo de imobilidade dos animais foi avaliado no teste do nado forçado por 3 min (180 seg). Cada barra representa a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo. * $p \leq 0,05$ representa diferença estatística em relação aos animais controles OF. # $p \leq 0,05$ representa diferença estatística em relação aos animais que sobreviveram à sepse (ANOVA, Teste de Newman Keuls). OF+SAL= Operação fictícia+Salina, OF+CAF= Operação fictícia+Cafeína, S+SAL= Sepse+Salina, S+CAF= Sepse+Cafeína.

4.4 Teste da Esquiva inibitória

Os animais que sobreviveram à sepse experimental apresentaram um prejuízo tanto da aquisição quanto da retenção de memória, demonstrados pela diminuição do tempo de permanência dos animais na plataforma. A cafeína, por sua vez, aumentou o tempo de permanência dos animais que sobreviveram a sepse, na plataforma com resposta parecida pelos animais controles do grupo OF+CAF ($p \leq 0,05$), independente do tempo de tratamento (Figuras 13 e 14).

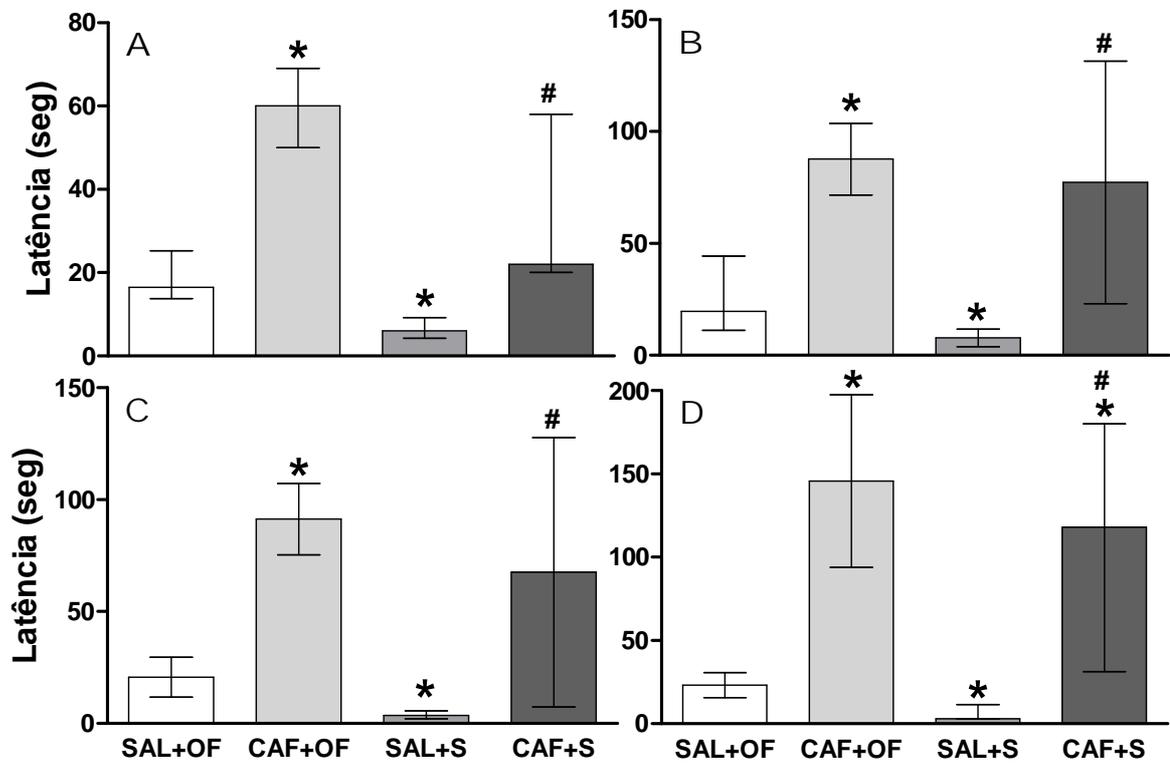


Figura 13: Efeitos da cafeína (10 mg/kg) administrada em ratos durante uma semana pré e uma semana pós-procedimentos cirúrgicos. A avaliação foi feita no teste da esQUIVA inibitória por 3 min (180 seg), para a avaliação da aquisição (A e B) e retenção (C e D) da memória de curta duração (MCD - A e C) e longa duração (MLD - B e D). Os dados são representados com as medianas (intervalos interquartis) da latência na plataforma. * $p \leq 0,05$ representa diferença estatística em relação aos respectivos animais controles SAL+OF; # $p \leq 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo de ratos que sobreviveram à sepse SAL+S. Kruskal-Wallis, teste de Mann-Whitney. SAL+OF=Salina+Operação fictícia, CAF+OF=Cafeína+Operação fictícia, SAL+S= Salina+Sepse, CAF+S= Cafeína+Sepse

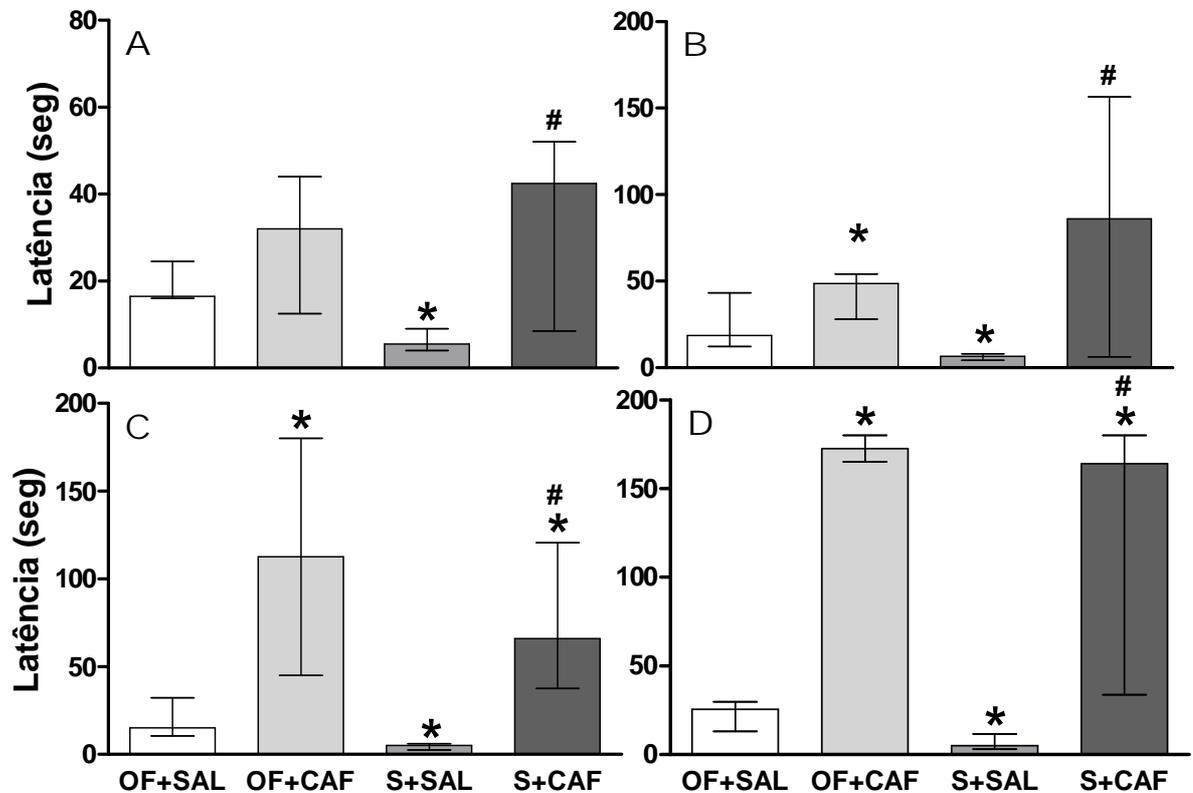


Figura 14: Efeitos da cafeína (10 mg/kg) administrada em ratos durante uma semana pós os procedimentos cirúrgicos de indução de sepse. A avaliação foi feita no teste da esquiua inibitória por um período máximo de 3 min (180 seg), para a avaliação da aquisição (A e B) e retenção (C e D) da memória de curta duração (MCD - A e C) e longa duração (MLD - B e D). Dados são representados com as medianas (intervalos interquartis) da latência na plataforma. * $p \leq 0,05$ representa diferença estatística em relação aos respectivos animais controles OF+SAL; # $p \leq 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo de ratos que sobreviveram à sepse S+SAL. Kruskal-Wallis, teste de Mann-Whitney. SAL+OF= Operação fictícia+Salina, OF+CAF= Operação fictícia+Cafeína, S+Sal= Sepse+Salina, S+CAF= Sepse+Cafeína.

4.5 Teste do Reconhecimento social

A cafeína administrada durante uma [$F_{(3,39)}=1,406$; $p=0,2568$] e duas semanas [$F_{(3,39)}=1,406$; $p=0,2568$] reduziu o tempo de investigação dos animais controles OF, sem nenhuma observação relevante nos demais grupos, conforme demonstrado nas Figuras 15 e 16.

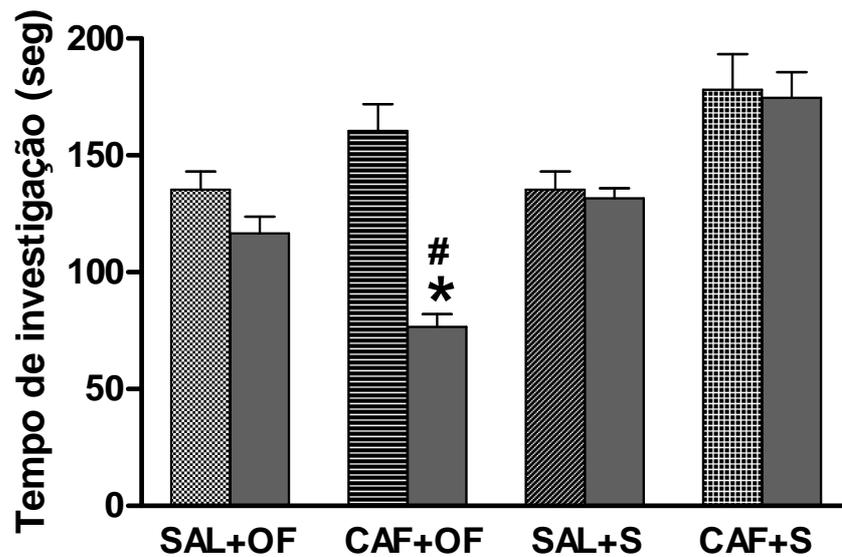


Figura 15: Efeitos da cafeína (10 mg/kg) administrada em ratos durante uma semana pré e uma semana pós-procedimentos cirúrgicos. A avaliação foi feita no teste de Reconhecimento social por um período máximo de 3 min (180 seg). As barras claras representam a primeira exposição, enquanto as barras escuras representam a segunda exposição no teste de Reconhecimento social. Dados são representados como a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo. * $p \leq 0,05$ em comparação aos respectivos animais controles do mesmo grupo (ANOVA, Teste de Newman Keuls). SAL+OF= Salina +Operação fictícia, CAF+OF= Cafeína+Operação fictícia, SAL+S= Salina+Sepse, CAF+S= Cafeína+Sepse.

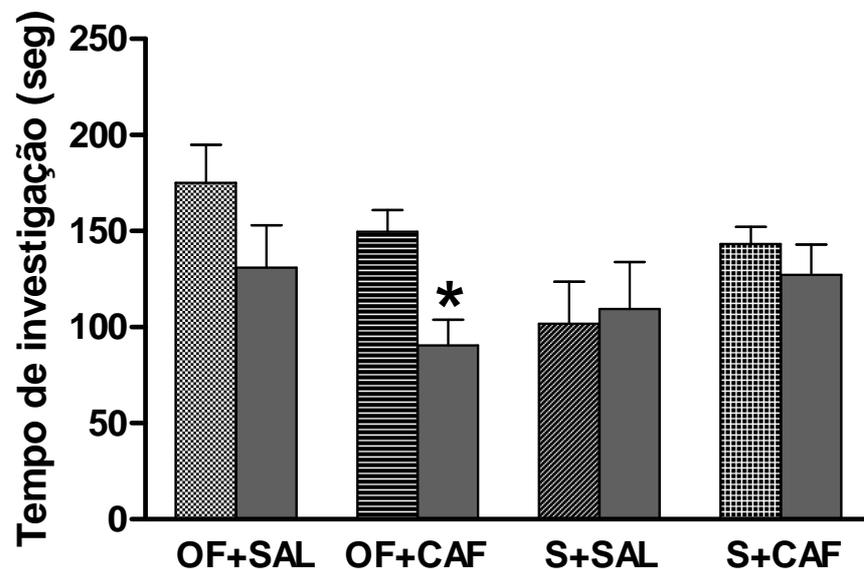


Figura 16: Efeitos da cafeína (10 mg/kg) administrada em ratos durante uma semana pós- procedimentos cirúrgicos de indução de sepse. A avaliação foi feita no teste de Reconhecimento social por um período máximo de 3 min (180 seg). As barras claras representam a primeira exposição, enquanto as barras escuras representam a segunda exposição no teste de Reconhecimento social. Dados são representados como a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo. * $p \leq 0,05$ em comparação aos respectivos animais controles do mesmo grupo (ANOVA, Teste de Newman Keuls). SAL+OF= Salina +Operação fictícia, CAF+OF= Cafeína+Operação fictícia, SAL+S= Salina+Sepse, CAF+S= Cafeína+Sepse.

5. *D*ISSCUSSÃO

Os resultados mostraram que o efeito psicoestimulante da cafeína pode reduzir os níveis de ansiedade, depressão e os prejuízos de MCD e MLD dos animais que sobreviveram à sepse experimental, sem qualquer interferência na atividade locomotora, sugerindo que provavelmente os receptores adenosinérgicos devem contribuir, de alguma forma, para os resultados obtidos.

A hipótese da participação dos receptores adenosinérgicos nas respostas aqui observadas deve-se ao fato de que esse sistema produz efeito de elevado grau de complexidade e possui propriedades multifacetadas no SNC, exercendo a sua influência na comunicação neuronal, de tal forma que seus ligantes funcionam como um modulador universal, sendo a principal molécula envolvida na coordenação, controle e sincronização da liberação de muitos mediadores sinápticos (ARAB et al., 2013).

Em estudos envolvendo os seres humanos foi demonstrado que os pacientes sobreviventes à sepse em unidades de tratamentos apresentam sintomas afetivos, tais como ansiedade e depressão (JONES e GRIFFITHS, 2013). A prevalência e a severidade dessas desordens afetivas, nesses tipos de sobreviventes, foi de <10 a 58% (JACKSON, 2003). Nossos resultados com animais experimentais, que foram submetidos a condições semelhantes aos de pacientes críticos, também apresentaram sintomas sugestivos dos referidos quadros psicocomportamentais e cognitivos, apresentando uma taxa de mortalidade de cerca de 40-50%.

Dessa forma, os resultados da presente pesquisa mostraram que ratos sobreviventes à sepse apresentaram comportamento do tipo ansiogênico, que foram caracterizados pela redução do %EBA e %TBA. A cafeína, por sua vez, quando administrada durante duas semanas (uma semana pré e uma semana pós-procedimentos cirúrgicos), reverteu essas respostas. Esses resultados pareceram ser específicos da propriedade ansiolítica, visto que os animais que sobreviveram à sepse elevaram o percentual de %EBA e %TBA, sem interferências na locomoção avaliada no Teste do Campo aberto e nem na frequência de EBF do LCE. Esses efeitos, entretanto, não foram observados

quando a cafeína foi administrada somente durante uma semana pós-procedimentos cirúrgicos.

Registros científicos mostram que o tratamento agudo com moderadas doses de cafeína estimula a atividade locomotora em roedores (FREDHOLM et al., 1999), enquanto o crônico causa uma diminuição nesse comportamento. Altas doses, por sua vez, também diminuem essa atividade (BUTT e SULTAN, 2011). Em nossas avaliações experimentais, nenhuma alteração na locomoção foi observada quando os animais foram submetidos ao teste do campo aberto e no LCE. Dessa forma, sugere-se que os efeitos observados da cafeína não são decorrentes de possíveis efeitos estimulatórios que possam ter interferido nos demais comportamentais observados.

Em decorrência desses fatores, os comportamentos sugestivos de depressão dos animais também foram avaliados no teste do Nado forçado. Foi observado que os sobreviventes à sepse aumentaram o tempo de imobilidade no referido teste, enquanto que a cafeína impediu a resposta tanto quando administrada em regime de tratamento agudo quanto em regime de tratamento subcrônico. Esses resultados corroboram aqueles observados por Tuon et al. (2007; 2008) que mostraram resultados similares em seus animais com 10 dias após as CLPC.

Comim et al. (2011a) também avaliaram os parâmetros sugestivos de depressão em ratos sobreviventes a sepse. Após o terceiro dia do procedimento cirúrgico os animais foram tratados com Imipramina (10 mg/kg) durante 14 dias. No 17º dia os animais foram anestesiados e o sangue foi retirado para análise dos hormônios corticosterona e ACTH. A glândula adrenal e o hipocampo foram isolados e pesados, sendo que essa última estrutura foi utilizada para determinar os níveis de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF). Foi observado que os ratos sépticos aumentaram os níveis de corticosterona e ACTH e diminuíram os níveis de BDNF no hipocampo. O tratamento com imipramina reverteu todos os parâmetros avaliados, sugerindo que os referidos animais apresentaram comportamentos sugestivos de depressão, com consequente

alteração no eixo hipotálamo-hipófise suprarenal e nos níveis de BDNF no hipocampo.

De acordo com a teoria de monoamina de depressão, distúrbios depressivos podem ser resultados de baixas concentrações de monoaminas, tais como norepinefrina, dopamina e serotonina em áreas do encéfalo. Esses diversos neurotransmissores estão envolvidos em uma variedade de alterações comportamentais e fisiológicas, como a ansiedade, amnésia, incoordenação motora, depressão, humor e convulsão (BUTT e SULTAN, 2011). Nossos resultados levam a crer que a cafeína provavelmente possa ter elevado o nível de monoaminas, o que favoreceu a reversão das respostas sugestivas de depressão. Cabe, entretanto, maiores investigações nos mecanismos moleculares que possam justificar essa nossa hipótese.

Nas últimas cinco décadas, a psicofarmacologia da depressão evoluiu rapidamente. Evidências têm mostrado o envolvimento dos antidepressivos tricíclicos, tais como nortriptilina e desipramina, se ligando aos receptores da adenosina e reduzindo a atividade do terminal nervoso cortical (DECKERT et al., 1989). Cabe destacar também que uma série de estudos mostrou que a administração da adenosina em animais experimentais, seja periférica ou intracerebroventricular, apresentou efeito sugestivo de depressão, o qual envolveu o recrutamento de receptores adenosinérgicos, o sistema óxido-nítrico-GMPc e o sistema opióide (KASTER et al., 2004; 2005; 2007).

Quanto aos aspectos cognitivos, a ação da cafeína altera, de maneira positiva, as suas respostas, ao reforçar o aprendizado e a memória. A sua interferência no sistema adenosinérgico, principalmente no hipocampo, região altamente enriquecida em receptores da adenosina do tipo A₁, provavelmente justifica o aumento da potenciação de certos tipos de memórias decorrentes dessa substância (BOROTA et al., 2014). Além do hipocampo, várias outras regiões também podem ter um papel na consolidação da memória, incluindo o córtex cingulado anterior, o córtex pré-frontal medial, a amígdala basolateral e áreas mesolímbicas dopaminérgicas (HECKMAN et al., 2013).

Existem diversas formas de classificação para a memória, sendo que elas apresentam pontos em comum como, por exemplo, a conservação do passado através de imagens ou representações que podem ser evocadas, mas não realidades. Quando se diz a palavra memória, a primeira que salta à evocação não é a das experiências individuais dos homens e dos animais, mas sim aquela que, de alguma maneira se armazena no cérebro. Desde um ponto de vista prático, sua conceituação traz como sendo o armazenamento e evocação de informação adquirida através de experiências, onde sua aquisição denomina-se aprendizado. Não há memória sem aprendizado, nem há aprendizado sem experiências (MARSHALL, 1988).

Baseado nessas informações teve-se interesse em avaliar a aquisição e a retenção de memória nos ratos que passaram por procedimentos cirúrgicos. Os ratos sobreviventes à sepse apresentaram prejuízos tanto na aquisição quanto na retenção de MCD e MLD, que foram caracterizados pela redução do tempo de latência na plataforma do teste de esquiva inibitória, quando os animais foram avaliados no tempo máximo de 3 min (180 seg). A cafeína impediu as respostas deletérias dos déficits cognitivos decorrentes da sepse induzida experimentalmente. Independente do tempo de administração desse psicoativo, os animais controles OF permaneceram mais tempo na plataforma que os animais controles que receberam SAL.

Complementando esses achados, os animais também foram avaliados no teste do Reconhecimento Social. Observou-se que os animais do grupo OF, quando administrados com cafeína, houve uma redução no tempo de reconhecimento dos animais juvenis, características sugestivas de MCD. Em contrapartida, a cafeína não interferiu na memória dos animais que sobreviveram à sepse. Esses resultados não reproduziram aqueles observados no teste da esquiva inibitória, provavelmente em decorrência das peculiaridades de cada modelo experimental ou da redução do tempo de $\frac{1}{2}$ vida da cafeína tendo em vista ser a última etapa na qual os animais foram avaliados.

Vários outros estudos mostraram também efeitos positivos da cafeína em animais saudáveis. No entanto, Angelucci et al. (2002) verificaram que a

administração aguda de baixa dose dessa substância melhorou somente a memória de retenção, mas não a de aquisição ou de trabalho, pelo menos na tarefa de labirinto aquático de Morris, sugerindo seu efeito benéfico em situações espaciais, ou seja, em memórias dependentes do hipocampo (GUILLET et al., 1997).

O consumo de longa duração do café, uma das principais fontes de cafeína, não tem sido amplamente examinado por seus efeitos protetores nos comportamentos cognitivos e motores. Em uma série de estudos usando camundongos transgênicos a cafeína protegeu e reverteu a perda de memória e suas patologias na Doença de Alzheimer (ARENDASH e CAO, 2010). Além disso, a cafeína e o café cafeinado (mas não o descafeinado) afetaram os níveis plasmáticos de proteínas beta-amilóides em camundongos e em humanos com a referida doença (CAO et al., 2009). Estes trabalhos concluíram que a triagem clínica é deficiente para testar o uso da cafeína e do café cafeinado, mas seus consumos são considerados seguros, de custo baixo e na terapia efetiva contra a Doença de Alzheimer (ARENDASH e CAO, 2010).

Além disso, cabe destacar que o tratamento intraperitoneal agudo com café cafeinado, mas não com café descafeinado ou cafeína sozinha, aumentou os níveis plasmáticos de fatores estimulantes de colônia de granulócitos (FECG), interleucinas 6 e 10 (IL 6 e IL 10). Somente o aumento do FECG no plasma foi correlacionado com o aumentado desempenho cognitivo seguido do tratamento de longa duração com café descafeinado. Foi sugerido que outro componente do café potencia a cafeína para aumentar os níveis plasmáticos do FECG, resultando em múltiplas ações terapêuticas do café contra a Doença de Alzheimer (CAO et al., 2011).

Ao contrário dos resultados observados nesta pesquisa, outros autores têm demonstrado que a cafeína parece não ser a responsável pelos efeitos neuroprotetores que justifiquem os comportamentos cognitivos, uma vez que estes podem ser atribuídos a outros componentes bioativos como, por exemplo, polifenóis presentes no café, que provavelmente podem complementar ou potencializar os efeitos da cafeína na produção de suas ações benéficas (CAO et al.,

2011). Essas observações foram baseadas em um trabalho em que uma dieta que continha café 0,165% (3 xícaras) e 0,55% (10 xícaras) foi administrada a ratos, melhorando as tarefas de memória de trabalho no labirinto aquático de Morris comparados com aquelas realizadas por ratos alimentados com dietas controles (SHUKITT-HALE et al., 2013).

A cafeína pode melhorar o desempenho de seus consumidores em tarefas simples, mas não está claro se ela pode afetar as tarefas complexas ou possa interferir no estado de alerta e orientação. Tendo em vista esse consenso, um estudo controlado duplo cego com placebos verificou a influência desse psicoativo em adultos saudáveis. Foi observado que a cafeína melhorou o desempenho tanto de tarefas simples quanto complexas. Além disso, não houve evidências conclusivas de que os efeitos da cafeína estivessem relacionados à dose, ou se a influência no consumo habitual da mesma estivesse envolvida no desempenho (EINOTHER e GIESBRECHT, 2013).

Considerando esses achados relacionados ao consumo da cafeína, associados aos resultados observados em nossas pesquisas, não podemos afirmar que os receptores adenosinérgicos possam estar diretamente envolvidos com as respostas comportamentais e cognitivas observadas nos animais que sobreviveram a sepse. No entanto, visto que muitos dados recentes têm mostrado que esses receptores têm uma participação ativa em vários processos infecciosos fica aqui uma lacuna a ser avaliada que possa justificar os resultados aqui observados.

Coopersmith et al. (2006) por exemplo, realizaram um estudo animal a fim de investigar a modulação da fase imunossupressora da sepse. Para tal, usaram o modelo de CLPC, seguido pela indução de *Pseudomonas aeruginosa* causadora de pneumonia. A apoptose se constituiu em um dos mecanismos-chave na patogenicidade da sepse levando a morte de linfócitos e células dendríticas, contribuindo, assim, para a imunossupressão, o que caracterizou o distúrbio séptico. Para reversão dessa patogenicidade séptica, os pesquisadores avaliaram a participação dos receptores adenosinérgicos nas respostas celulares. Observaram que estes tipos de receptores eram alvos importantes na reversão

das características apresentadas diante da apoptose.

Portanto, considerando os achados aqui apresentados, corroborados pelos dados obtidos por vários outros pesquisadores, o consumo de cafeína pode se constituir em um alvo promissor para futuras investigações científicas no que concerne as suas ações sobre os seus receptores, principalmente, os adenosinérgicos, nos déficits comportamentais e cognitivos associados às sequelas decorrentes de um provável quadro de encefalopatia séptica.

6. CONCLUSÕES

O conhecimento reunido sobre o impacto do consumo de cafeína nas doenças infecciosas sistêmicas conduz à conclusão de que o consumo agudo ou subcrônico de dose moderada de cafeína (10 mg/Kg) parece ter benefícios profiláticos e/ou paliativos. Dessa forma os resultados observados foram:

1. Os animais que sobreviveram à sepse apresentaram diminuição nas %EBA e %TBA do LCE. Essa resposta pareceu ser sugestiva de ansiedade (ansiolítica), visto que tanto a locomoção quanto EBF no LCE não foram afetadas.
2. Os animais previamente mencionados apresentaram comportamento sugestivo de depressão, que foi caracterizado pelo aumento no tempo de imobilidade no teste do Nado forçado.
3. A sepse induzida experimentalmente induziu déficits cognitivos relacionados a MCD e MLD no teste da Esquiva inibitória, observados pela redução no tempo de latência na plataforma do aparato.
4. A MCD avaliada no mesmo grupo experimental, não foi afetada no teste de Reconhecimento social, visto que quando os ratos juvenis foram expostos pela segunda vez aos ratos adultos, estes não foram capazes de reconhecê-los.
5. Nos animais controles OF, a cafeína apresentou um aumento nas %EBA e %TBA do LCE. Essa resposta pareceu ser sugestiva de efeito ansiolítico, visto que tanto a locomoção no teste do Campo aberto, quanto as EBF no LCE não foram afetadas.
6. A cafeína impediu a resposta ansiolítica decorrente da sepse induzida experimentalmente, produzindo uma resposta similar aos animais controles OF tratados com CAF. Essa resposta pareceu ser dependente do tempo de tratamento, visto que nos animais tratados pós-procedimentos cirúrgicos estas respostas não foram observadas.

7. O efeito sugestivo de depressão dos ratos sobreviventes à sepse, caracterizado pelo aumento do tempo de imobilidade, foi bloqueado pela CAF independente do tempo de tratamento (agudo e subcrônico).
8. O efeito psicoestimulante da CAF melhorou as respostas cognitivas dos ratos sobreviventes à sepse, tanto na aquisição quanto na retenção, independente do tempo de tratamento, cujos resultados foram observados pelo aumento no tempo de latência na plataforma no teste da Esquiva inibitória.
9. A cafeína não foi eficaz na MCD no teste de Reconhecimento social, visto que quando os ratos juvenis foram expostos pela segunda vez aos ratos adultos, estes não foram capazes de reconhecê-los.

7. *CONSIDERAÇÕES FINAIS*

O potencial neuroprotetor da cafeína e os seus possíveis efeitos adversos, parecem contrariar muitos profissionais de saúde, quando recomendam aos seus pacientes diminuir o consumo de café como medida integrada nos hábitos e estilos de vida. Não havendo contraindicações, o consumo dessa substância parece ter uma relação risco benefício favorável.

As pesquisas envolvendo os receptores adenosinérgicos têm demonstrado ser uma ferramenta farmacológica útil para investigar as doenças do cérebro. O atual estado da arte no campo da investigação de nosso estudo reside na compreensão dos alvos responsáveis pelas consequências deletérias da sepse, especificamente a encefalopatia séptica. Como tal, ainda existe espaço para investigação futura, principalmente nos processos celulares e moleculares inerentes à disfunção cerebral.

O conhecimento do sistema neuromodulador adenosinérgico e seus respectivos antagonistas, como a cafeína, por exemplo, abre caminhos para futuras investigações na área das doenças infecciosas sistêmicas. Embora ainda existam muitas lacunas em aberto, parece haver um grande potencial para explorar o papel dos receptores adenosinérgicos nas sequelas comportamentais/cognitivas decorrentes da sepse, de forma a desenvolver estratégias para sua prevenção e/ou tratamento. Isso se baseia no fato de que neste tipo de infecção percebe-se que os níveis extracelulares de adenosina estão em quantidades elevadas.

Há, entretanto, uma necessidade urgente em desenvolver medidas terapêuticas que tenham custos benefícios de cuidados médicos, sociais e estratégias de prevenção baseadas na evidência. Os esforços para melhorar a qualidade e disponibilidade de cuidados, assim como para procurar tratamentos mais eficazes para a sepse, devem ser realizados em conjunto com um investimento em medidas de prevenção primária. É necessária mais investigação de forma a identificar fatores protetores e/ou de risco.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angelucci ME, Cesário C, Hiroi RH, Rosalen PL, Cunha C. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. *Braz J Med Biol Res*, 35:1201-1208, 2002.

Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*, 29:109-116, 2001.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29:1303-1310, 2001.

Arab L, Khan F, Lam H. Epidemiologic evidence of a relationship between tea, coffee, or caffeine consumption and cognitive decline. *Adv Nutr*, 1:115-122, 2013.

Arendash GW, Cao C. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 20:117-126, 2010.

Arendash GW, Scheif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, Shippy D, Tan J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience*, 142:941-952, 2006.

Ascherio A, Lucas M, Mirzaei F, Pan A, Okereke OI, Willett WC, O'Reilly ÉJ, Koenen K. Coffee, caffeine, and risk of depression among women. *Arch Intern Med*, 171:1571-1578, 2011.

Balk RA. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): Where did it come from and is it still relevant today? *Virulence*, 5:20-26, 2014.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*, 33: 221-223, 2005.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, Moreira JCF, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res*, 40: 831-837, 2007.

Berrendero F, Castañé A, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. Increase of morphine withdrawal in mice lacking A2a receptors and no changes in CB1/A2a double knockout mice. *Eur J Neurosci*, 2:315-324, 2003.

Bezerra IL, Souza AM, Pereira RA, Sichieri R. Consumption of foods away from home in Brazil. *Rev Saude Publica*, 47:1-12, 2013.

Bilbao A, Melchor JC, Cobos P, Centeno M, Pijoan JI, Fernandez-Llebrez L, Martinez-Astorquiza T. Does fetal weight estimated by ultrasound really affect the success rate of external cephalic version? *Acta Obstet Gynecol Scand*, 10:1101-1106, 2009.

Bloos F, Reinhart K. Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence*, 5:154-160, 2014.

Boison D. Methylxanthines, seizures, and excitotoxicity. *Handb Exp Pharmacol*, 200:251-266, 2011.

Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS. The changing immune system in sepsis: Is individualized immuno-modulatory therapy the answer? *Virulence*, 5:45-56, 2014.

Borota D, Murray E, Keceli G, Chang A, Watabe JM, Ly M, Toscano JP, Yassa MA. Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. *Nat Neurosci*, 17:201-203, 2014.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*, 4:854-865, 2005.

Butt MS, Sultan MT. Coffee and its consumption: benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51:363-373, 2011.

Cao C, Cirrito JR, Lin X, Wang L, Verges DK, Dickson A, Mamcarz M, Zhang C, Mori T, Arendash GW, Holtzman DM, Potter H. Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of Alzheimer's disease transgenic mice. *J Alzheimers Dis*, 17:681-697, 2009.

Cao C, Wang L, Lin X, Mamcarz M, Zhang C, Bai G, Nong J, Sussman S, Arendash G, Mori T, Arendash G. Caffeine synergizes with another coffee component to increase plasma GCSF: linkage to cognitive benefits in Alzheimer's mice. *J Alzheimers Dis*, 25:323-335, 2011.

Castro AA, Ghisoni K, Latini A, Quevedo J, Tasca CI, Prediger RD. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 229:208-215, 2012.

Chen JF, Chern Y. Impacts of methylxanthines and adenosine receptors on neurodegeneration: human and experimental studies. *Handb of Exp Pharmacol*, 200:267-310, 2011.

Chu YF, Brown PH, Lyle BJ, Chen Y, Black RM, Williams CE, Lin YC, Hsu CW, Cheng IH. Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. *J Agric Food Chem*, 57:9801-9808, 2009.

Clark CM, Morefield PE, Gilliam FS, Pardo LH. Estimated losses of plant biodiversity in the United States from historical N deposition (1985-2010). *Ecology*, 94:1441-1448, 2010.

Comim CM, Omar J, Cassol-Jr O, Constantino C, Petronilho F, Constantino LS, Stertz L, Kapczinski F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Depressive-Like Parameters in Sepsis Survivor Rats. *Neurotox Res*, 17:279-286, 2011a.

Comim CM, Constantino LS, Petronilho F, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Aversive memory in sepsis survivor rats. *J Neural Transm*, 118:213-217, 2011b.

Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Schwulst SJ, Davis CG. Adoptive transfer of dying cells causes bystander-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 3:780-785, 2006.

Cordioli RL, Cordioli E, Negrini R, Silva E. Sepsis and pregnancy: do we know how to treat this situation? *Rev Bras Ter Intensiva*, 25:334-344 2013.

Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 49:171-176, 1994.

Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, 5:238-245, 2002.

Dal-Ben D, Buccioni M, Lambertucci C, Kachler S, Falgner N, Marucci G, Thomas A, Cristalli G, Volpini R, Klotz KN. Different efficacy of adenosine and NECA derivatives at the human A3 adenosine receptor: Insight into the receptor activation switch. *Biochem Pharmacol*, 87:321-331, 2014.

Dantzer R, Gonyou HW, Curtis SE, Kelley KW. Changes in serum cortisol reveal function differences in frustration-induced chain chewing in pigs. *Physiol Behav*, 39:775-777, 1987.

Deckert J, Strik WK, Fritze J. Organic schizophrenic syndrome associated with symmetrical basal ganglia sclerosis and XO/XY-mosaic. *Biol Psychiatry*, 4:401-403, 1989.

Einöther SJ, Giesbrecht T. Caffeine as a attention enhancer: reviewing existing assumptions. *Psychopharmacology*, 225:251-274, 2013.

Escudeiro SS, Soares PM, Almeida AB, de Freitas Guimarães Lobato R, de Araujo DP, Macedo DS, Sousa FC, Patrocínio MC, Vasconcelos SM. Antidepressant effect of aminophylline after ethanol exposure. *Sci Pharm*, 81:211-222, 2013.

Esther P, Suzanne H, Rosalinde M, Peter P. Alkaline Phosphatase: A Possible Treatment for Sepsis-Associated Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients *Am J Kidney Dis*, 1-11, 2014.

Fang J, Lian Y, Xie K, Cai S, Wen P. Epigenetic modulation of neuronal apoptosis and cognitive functions in sepsis-associated encephalopathy. *Neurol Sci*, 35:283-288, 2014.

Ferre S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem*, 105:1067-1079, 2008.

Ferre S, Justinova Z, Barnes C, Wertheim CE, Pappas LA, Goldberg SR, Le Foll B. Effects of chronic caffeine exposure on adenosinergic modulation of the discriminative-stimulus effects of nicotine, methamphetamine, and cocaine in rats. *Psychopharmacology*, 2:355-367, 2008.

Ferre S. Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. *J Alzheimers Dis*, 1:35-49, 2010.

Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*, 61: 857-872, 2004.

Frary A, Xu Y, Liu J, Mitchell S, Tedeschi E, Tanksley S. Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments. *Theor Appl Genet*, 111: 291-312, 2005.

Fredholm BB, Lindström K. Autoradiographic comparison of the potency of several structurally unrelated adenosine receptor antagonists at adenosine A1 and A(2A) receptors. *Eur J Pharmacol*, 380:197-202, 1999.

Fredholm LM, Walker WC, Cifu DX, Ochs AL, Lew HL. Sensorintegrative dysfunction underlying vestibular disorders after traumatic brain injury: a review. *J Rehabil Res Dev*, 49:985-994, 2012.

Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med*, 26:2078-2086, 1998.

Gettys GC, Liu F, Kimlin E, Baghdoyan HA, Lydic R. Adenosine A (1) receptors in mouse pontine reticular formation depress breathing, increase anesthesia recovery time, and decrease acetylcholine release. *Anesthesiology*, 118:327-336, 2013.

Guillet JG, Butor C, Duquenne O, Mignon-Godefroy K, Mouglin C. Solid phase cytometry allows rapid in situ quantification of human papilloma virus infection in biopsy material. *Cytometry*, 4:292-297, 1997.

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 327:1-5, 1994.

Harro J, Tonissar M, Eller M, Kask A, Oino LS, Petronilho F, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Aversive memory in sepsis survivor rats. *J Neural Transm*, 118:213-217, 2011.

Heckman MA, Weil J, Gonzalez EM. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *J Food Sci*, 75:1-11, 2010.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Lima RH, Medina JH, Cammarota M. Age-dependent and age-independent human memory persistence is enhanced by delayed posttraining methylphenidate administration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:19504-19507, 2008.

Jackson KC 2nd, St Onge EL. Antidepressant pharmacotherapy: considerations for the pain clinician. *Pain Pract*, 2:135-143, 2003.

John PH, Jason NP, Melissa ER, Luke J H. Adenosine and its receptors in the heart: Regulation, retaliation and adaptation. *Biochim Biophys Acta*, 1808:1413-1428, 2012.

Jones C, Griffiths RD. Mental and physical disability after sepsis. *Minerva Anesthesiol*, 79:1306-1312, 2013.

Jung E, Perrone EE, Brahmamdan P, McDonough JS, Leathersich AM, Dominguez JA, Clark AT, Fox AC, Dunne WM, Hotchkiss RS, Coopersmith CM. Inhibition of intestinal epithelial apoptosis improves survival in a murine model of radiation combined injury. *PLoS One*, 8:1-28, 2013.

Kaster MP, Rosa AO, Rosso MM, Goulart EC, Santos AR, Rodrigues AL. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. *Neurosci Lett*, 2:21-24, 2004.

Kaster MP, Rosa AO, Santos AR, Rodrigues AL. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. *Int J Neuropsychopharmacol*, 4:601-606, 2005.

Kaster MP, Budni J, Santos AR, Rodrigues AL. Pharmacological evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, 576:91-98, 2007.

Kessler RC, Blazer DG, McGonagle KA, Swartz MS. The prevalence and distribution of major depression in a national community sample: the National Comorbidity Survey. *Am J Psychiatry*, 7:979-986, 1994.

Killer SC, Blannin AK, Jeukendrup AE. No evidence of dehydration with moderate daily coffee intake: a counterbalanced cross-over study in a free-living population. *PLoS One*, 9:1-20, 2014.

King EG, Bauzá GJ, Mella JR, Remick DG. Pathophysiologic mechanisms in septic shock. *Lab Invest*, 94:4-12, 2014.

Kirby LG, Lucki I. The effect of repeated exposure to forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the rat. *Stress*, 4:251-263, 1998.

Kumar V. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signal*, 9:145-165, 2013.

Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Neuroscience*, 6643:674-678, 1997.

Leite FB, Prediger RD, Silva MV, de Sousa JB, Carneiro FP, Gasbarri A, Tomaz C, Queiroz AJ, Martins NT, Ferreira VM. Role of nicotine on cognitive and behavioral deficits in sepsis-surviving rats. *Brain Res*, 1507:74-82, 2013.

Liu X, Ren H, Peng D. Sepsis biomarkers: an omics perspective. *Front Med*, 8:58-67, 2014.

Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, Serra S, Deaglio S. Biological functions of ectoenzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *J Mol Med*, 91:165-172, 2013.

Lucena GM, Porto FA, Campos EG, Azevedo MS, Cechinel-Filho V, Prediger RD, Ferreira VM. *Cipura paludosa* attenuates long-term behavioral deficits in rats exposed to methylmercury during early development. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73:1150-1158, 2010.

Lucena GM, Prediger RD, Silva MV, Santos SN, Silva JF, Santos AR, Azevedo MS, Ferreira VM. Ethanolic extract from bulbs of *Cipura paludosa* reduced long-lasting learning and memory deficits induced by prenatal methylmercury exposure in rats. *Dev Cogn Neurosci*, 3:1-10, 2013.

Magkos F, Kavouras SA. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45:535-562, 2005.

Maia CS, Lucena GM, Corrêa PBF, Serra RB, Matos RWM, Menezes FC, Santos SN, Sousa JB, Costa ET, Ferreira VM. Interference of ethanol and methylmercury

in the developing central nervous system. *Neurotoxicology*, 30:23-30, 2009.

Marin MT, Zancheta R, Paro AH, Possi AP, Cruz FC, Planeta CS Comparison of caffeine-induced locomotor activity between adolescent and adult rats. *Eur J Pharmacol*, 660:363-367, 2011.

McGaugh JL et al. Stria terminalis lesions attenuate the effects of posttraining naloxone and b-endorphin on retention. *Behav Neurosci*, 100:839-844, 1987.

Marshall JC. Sensation and semantics. *Nature*, 334: 378, 1988.

Marshall JC. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med*, 1-9, 2014.

Martin MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PH, Paulino N. Pheonolic compounds from Brazilian caffeine with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*, 74:105-112, 2000.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348:1546-1554, 2003.

Mayer S, Yasir Al-Q, Paul K. Definitions and Pathophysiology of Sepsis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 43: 260-263, 2013.

McBride WJ, Chernet E, McKinzie DL, Lumeng L, Li TK. Quantitative autoradiography of mu-opioid receptors in the CNS of alcohol-naive alcohol-preferring P and -nonpreferring NP rats. *Alcohol*, 16:317-323, 1998.

Mitchell DC, Knight CA, Hockenberry J, Teplansky R, Hartman TJ. Beverage caffeine intakes in the U.S. *Food Chem Toxicol*, 63:136-142, 2014.

Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol*, 48:254-260, 1955.

Musie E, Moore CC, Martin EN, Scheld WM. Toll-Like Receptor 4 Stimulation before or after *Streptococcus pneumoniae* Induced Sepsis Improves Survival and Is Dependent on T-Cells. *PLoS One*, 9:1-18, 2014.

Nelson A, Berkestedt I, Bodelsson M. Circulating glycosaminoglycan species in septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand*, 58:36-43, 2014.

O'Connor TG, Spagnola ME. Early stress exposure: concepts, findings, and implications, with particular emphasis on attachment disturbances. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 3:1-24, 2009.

Ogawa N, Ueki H. Caffeine dependence. *Nihon Rinsho*, 68:1470-1474, 2010.

Pellow PG, Hodgson SA, Hodgson A, Rance E, Ellender M, Guilmette RA, Stradling GN. Comparison of absorption after inhalation and instillation of uranium octoxide. *Radiat Prot Dosimetry*, 105:105-108, 1985.

Perry AE, Neilson M, Martyn-St James M, Glanville JM, McCool R, Duffy S, Godfrey C, Hewitt C. Interventions for female drug-using offenders. *Cochrane Database Syst Rev*, 1-9, 2014.

Pinheiro da Silva F, Zampieri FG, Barbeiro DF, Barbeiro HV, Goulart AC, Torggler Filho F, Velasco IT, da Cruz Neto LM, de Souza HP, Machado MC. Septic shock in older people: a prospective cohort study. *Immun Ageing*, 10:21, 2013.

Popoli P, Pepponi R. Potential therapeutic relevance of adenosine A2B and A2A receptors in the central nervous system. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11:664-674, 2012.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 267:730-732, 1977.

Prediger RD, Batista LC, Morato GS, Takahashi RN. Blockade of adenosine and dopamine receptors inhibits the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacology*, 4:714-721, 2005.

Pytel P, Alexander JJ. Pathogenesis of septic encephalopathy. *Curr Opin Neurol*, 22: 283-287, 2009.

Ribeiro JA, Sebastião AM. Caffeine and adenosine. *J Alzheimers Dis*, 1:3-15, 2010.

Rivera-Oliver M, Díaz-Ríos M. Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: A review. *Life Sci*, 1-9, 2014.

Romay E, Ferrer R. Future options for (economically) sustainable research in sepsis. *Blood Purif Suppl*, 1:18-21, 2014.

Ronco C. Endotoxin removal: history of a mission. *Blood Purif Suppl*, 1:5-8, 2014.

Sales Júnior JA, David CM, Hatum R, Souza PC, Japiassú A, Pinheiro CT, Friedman G, Silva OB, Dias MD, Koterba E, Dias FS, Cláudio Piras C, Grupo de Estudo de Sepse do Fundo AMIB, Luiz RR. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *Rev Bras Ter Intensiva*, 18:9-17, 2006.

Shen E, Chen H, Liu Y, Wang H, Du N, Niu J, Ye H, Chen M. Molecular evidence for spread of two major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones with a unique geographic distribution in Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, 2:512-518, 2009.

Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int J Mol Sci*, 15:2024-2052, 2014.

Shukitt-Hale B. The effects of aging and oxidative stress on psychomotor and

cognitive behavior. *Age*, 22:9-17, 1999.

Shukitt-Hale B, Miller GM, Chu YF, Lyle BJ, Joseph JA. Coffee, but not caffeine, has positive effects on cognition and psychomotor behavior in aging. *Age*, 35:2183-2192, 2013.

Siqueira-Batista R, Mendonça EG, Gomes AP, Vitorino RR, Miyadahira R, Alvarez-Perez MC, Oliveira MG. Proteomic updates on sepsis. *Rev Assoc Med Bras*, 58:376-382, 2012.

Steckert AV, de Castro AA, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with n-acetylcysteine, vitamins and statins. *Curr Neurovasc Res*, 11:83-90, 2014.

Streck EL, Comim CM, Barichello T, Quevedo J. The septic brain. *Neurochem Res*, 33:2171-2177, 2008.

Surbatovic M, Veljovic M, Jevdjic J, Popovic N, Djordjevic D, Radakovic S. Immunoinflammatory Response in Critically Ill Patients: Severe Sepsis and/or Trauma. *Mediators Inflamm*, 2013:1-31, 2013.

Tan YL, Hutchinson AL, Kidson-Gerber G. A Case of an Acquired Factor VIII Inhibitor Complicated by Multiple Treatment-Related Opportunistic Infections and Review of the Literature. *Case Rep Hematol*, 2013:1-10, 2013.

Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharm Biochem Behav*, 44:463-469, 1993.

Trincavelli ML, Giacomelli C, Daniele S, Taliani S, Cosimelli B, Laneri S, Severi E, Barresi E, Pugliesi I, Greco G, Novellino E, Da Settimo F, Martini C. Allosteric modulators of human A2B adenosine receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1840:1194-1203, 2014.

Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Memory-enhancing treatments reverse the impairment of inhibitory avoidance retention in sepsis-surviving rats. *Crit Care*, 5: 329-331, 2007.

Tuon T, Aguiar AS Jr, Soares FS, da Rocha LG, Silveira PC, Pinho RA. The effect of n-acetylcysteine and deferoxamine on exercise-induced oxidative damage in striatum and hippocampus of mice. *Neurochem Res*, 5:729-736, 2008.

Verma K, Lonner B, Dean L, Vecchione D, Kean K. Predictors of postoperative infection in spinal deformity surgery - which curves are at greatest risk? *Bull Hosp Jt Dis*, 4:257-264, 2013.

Wake G, Court J, Pickering A, Lewis R, Wilkins R, Perry E. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J Ethnopharmacol*, 69:105-114, 2000.

Wang D, Zhong X, Huang D, Chen R, Bai G, Li Q, Yu B, Fan Y, Sun X. Functional Polymorphisms of Interferon-gamma Affect Pneumonia-Induced Sepsis. *PLoS One*, 9:1-20, 2014.

Wiersinga WJ. Current insights in sepsis: from pathogenesis to new treatment targets. *Curr Opin Crit Care*, 5:480-486, 2011.

World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization among depression in Brazil. *WHO*, 91:93-101, 2013.

World Health Organization. mhGAP intervention guide for mental, neurological and substance use disorders in non-specialized health settings: mental health Gap Action Programme (mhGAP). WHO, 2010.

Yamada Y. Recent understanding of sepsis: mechanisms of organ dysfunction and advances in treatment --preface and comments. *Masui*, 3:276-277, 2008.

ANEXO



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 01 de julho de 2009.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **“AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS E PATOLÓGICAS EM RATOS QUE SOBREVIVEM À SEPSE E AS IMPLICAÇÕES DECORRENTES DO USO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.”**, UnBDOC nº 33880/2009, sob responsabilidade da Profa. Vânia Maria Moraes Ferreira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA