

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

CARINA DE SOUZA MOTA

EFEITO DO ESTRESSE E DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CAFEÍNA SOBRE
PARÂMETROS MITOCONDRIAIS, MAP2 E SINAPTOFISINA EM CÉREBRO DE
RATOS MACHOS E FÊMEAS.

PORTO ALEGRE – RS

2012

CARINA DE SOUZA MOTA

EFEITO DO ESTRESSE E DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CAFEÍNA SOBRE
PARÂMETROS MITOCONDRIAIS, MAP2 E SINAPTOFISINA EM CÉREBRO DE
RATOS MACHOS E FÊMEAS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Orientadora: Dr^a Letícia Ferreira Pettenuzzo

Porto Alegre – RS

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Mota, Carina

EFEITO DO ESTRESSE E DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE
CAFEÍNA SOBRE PARÂMETROS MITOCONDRIAIS, MAP2 E
SINAPTOFISINA EM CÉREBRO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS. /
Carina Mota. -- 2012.

88 f.

Orientadora: Leticia Ferreira Pettenuzzo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Bioquímica. I. Ferreira Pettenuzzo, Leticia,
orient. II. Título.

Dedicatória

Dedico essa dissertação aos meus pais, Vera e Otávio, pois devido às bases familiares sólidas que eles me proporcionaram e aos valores que me passaram eu consegui trilhar meu caminho com segurança, mas ciente de que, se em dado momento eu caísse, nunca estaria só.

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Leticia Pettenuzzo pela oportunidade, orientação, ensinamentos, paciência, incentivo, confiança e amizade, muitíssimo obrigada.

Às Professoras Carla Dalmaz e Deusa Vendite pela ajuda durante a realização deste trabalho, pelos ensinamentos e sugestões.

A todos os amigos do Laboratório de Neurobiologia do Stress pela ajuda, ensinamentos, convivência diária, amizade, risadas e companhia durante os “lanchinhos” sempre muito agradáveis.

Às antigas colegas de laboratório e amigas Simone Weis, sem a qual eu não teria chegado até aqui, e Gabi Dadalt, por ainda estar sempre presente, mesmo que não seja mais tanto quanto éramos acostumadas.

Aos meus pais pelo amor, confiança e apoio emocional e psicológico.

Às minhas irmãs, Melina e Sabrina, pelos exemplos, risadas e companhia, mesmo que esta atualmente seja apenas virtual.

Ao meu amor, Deco, pela paciência, motivação, pelo ombro amigo e apoio durante todo este trajeto.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Bioquímica, pelos ensinamentos, paciência e auxílios.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Estresse	02
1.2. Cafeína	04
1.3. Mitocôndria	06
1.4. Sexo	10
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS E RESULTADOS	15
3.1. Capítulo 1: Artigo submetido	17
3.2. Capítulo 2: Materiais e Métodos e Resultados Adicionais	47
3.2.1. Materiais e Métodos	47
3.2.2. Resultados	50
4. DISCUSSÃO	52
5. CONCLUSÕES	62
6. PERSPECTIVAS	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMO

Pesquisadores têm demonstrado que o estresse por contenção produz danos hipocampais e corticais, levando a consequências adversas no cérebro, como o aumento da sua vulnerabilidade a insultos. As alterações nos neurônios de córtex e hipocampo induzidas pelo estresse incluem, por exemplo, alterações nos espinhos dendríticos e na conectividade sináptica. Grande parte dos estudos que envolvem os efeitos do estresse foram conduzidos em machos, mas a resposta e adaptação ao estresse parece ser diferentes nas fêmeas. A cafeína é o estimulante mais amplamente consumido no mundo e está presente em várias fontes alimentares consumidas mundialmente, como bebidas à base de cola, barras de chocolate e refrigerantes. Estudos indicam que os efeitos agudos da cafeína e do estresse podem aumentar a expressão da citocromo oxidase, uma enzima da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Por outro lado, anormalidades na cadeia respiratória têm sido identificadas em diversas doenças neurodegenerativas, e o local destes defeitos varia de acordo com os mecanismos patogênicos envolvidos em cada doença. Visto que alterações mitocondriais podem estar associadas com doenças neurodegenerativas, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da cafeína (1g/L) e da exposição ao estresse crônico (contenção, 5 dias por semana/ 40 dias) em parâmetros mitocondriais em hipocampo, córtex cerebral e estriado de ratos Wistar machos e fêmeas. Além disso, nós avaliamos os efeitos destes tratamentos crônicos no conteúdo de sinaptofisina e MAP2 em hipocampo. No presente estudo foi encontrado que o conteúdo de sinaptofisina e MAP2 não foi afetado pelo estresse crônico e/ou cafeína, talvez devido à adaptação. Por outro lado, o estresse e a cafeína causaram alterações sexo e estrutura-específicas nos parâmetros mitocondriais analisados neste estudo. Visto que a cafeína apresentou pequenas alterações nos parâmetros mitocondriais analisados, acreditamos que o mecanismo da neuroproteção provocado pelo consumo crônico de cafeína não está relacionado com alterações na atividade das enzimas da cadeia respiratória.

ABSTRACT

Researchers have reported that restraint stress produces hippocampal and cortical damage leading to adverse consequences on brain function which can increase the brain vulnerability to insults. The stress alterations in neurons from cortex and hippocampus include, for example, changes in dendritic spines and synaptic connectivity. Most studies on stress effects were conducted in males but the response and adaptation to stress appear to be different in females. Caffeine is the most widely consumed stimulant in the world and is present in a number of dietary sources consumed worldwide, i.e., tea, cocoa beverages, chocolate bars and soft drinks. Studies indicate that acute caffeine and stress can increase the expression of cytochrome oxidase, a mitochondrial protein. On the other hand, abnormalities of mitochondrial respiratory chain have been identified in several neurodegenerative disorders and the locus of these defects probably varies according to the pathogenic mechanisms involved in each disorder. Since mitochondrial alteration can be associated with neurodegenerative disorders, the aim of the present study was to verify the effect of caffeine (1g/L) and stress (restraint stress 5 days week/ 40 days) chronic exposition in mitochondrial parameters in hippocampus, cortex and striatum of male and female Wistar rats. Also, we evaluated the effects of these chronic treatments on synaptophysin and MAP2 content in hippocampus. We found that synaptophysin and MAP2 content was not affected by chronic stress and/or caffeine, perhaps due to adaptation. On the other hand, stress and caffeine caused a sex and structure-specific alterations in mitochondrial parameters analyzed in this study. Since caffeine presented small changes in the analyzed mitochondrial parameters, we believe that the mechanism of neuroprotection provoked by caffeine chronic consumption is not related to alterations in respiratory chain enzymes activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

GR - receptor de glicocorticóides

MR – receptor de mineralocorticoides

MAP2 – proteína associada a microtúbulos-2

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse

Fisiologicamente, o estresse (série de respostas do organismo a um desafio que perturba a sua homeostase) e suas consequências são de extrema importância para a sobrevivência de um organismo em um mundo em constante mudança. Porém a estimulação exagerada deste sistema pode gerar problemas para o organismo. O estresse, tanto o agudo quanto o crônico, é capaz de induzir diversas respostas voltadas para a manutenção neuroendócrina e sobrevivência do organismo. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é o ponto de controle neuroendócrino e de mecanismos regulatórios por meio do qual o sistema nervoso central pode modular a secreção de hormônios periféricos e funções fisiológicas. Quando ativado pelo estresse, ocorre a secreção do hormônio liberador de corticotrofina do núcleo paraventricular hipotalâmico, que estimula a liberação de hormônio adrenocorticotrófico da glândula hipófise anterior. O hormônio adrenocorticotrófico, por sua vez, induz a liberação de glicocorticóides do córtex adrenal (Zavala et al, 2010).

Os glicocorticóides são importantes reguladores de processos básicos celulares, como o metabolismo energético, o crescimento, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência celular (Menezes-Ferreira e Torresani, 1983). Os efeitos dos glicocorticóides são mediados pelos receptores de glicocorticóides (GRs) e pelos receptores de mineralocorticoides (MRs). Esses dois tipos de receptores apresentam distribuição cerebral diferente e afinidade diferente pelo ligante. Os MRs estão localizados principalmente no hipocampo, particularmente nas células piramidais da região CA1 e possuem alta afinidade pelos glicocorticóides, ligando a estes mesmo em baixas concentrações. Os GRs, por sua vez, estão amplamente distribuídos no cérebro e possuem menor afinidade pelos glicocorticóides, necessitando de altas concentrações de glicocorticóides circulantes para que ocorra a ligação (Krozowski e Funder, 1983;

Beaumont e Fanestil, 1988; Rupprecht et al, 1993; Kawata, 1995). Quando está inativo, o GR se encontra no citosol na forma de um heterocomplexo formado por proteínas de choque térmico e imunofilinas. Quando o glicocorticóide se liga ao seu receptor, esse heterocomplexo sofre um remodelamento ativando-se. Essa ativação significa que o complexo ativado GR- glicocorticóide será translocado para o núcleo através do esqueleto de microtúbulos. No núcleo o GR irá transativar ou transreprimir múltiplos genes (Pratt et al, 2004). A transativação ocorre através da interação com os elementos de resposta aos glicocorticóides enquanto a transrepressão ocorre após a ligação e inativação do AP-1 e NFkB (Schaff e Cidlowski, 2002; Greenstein et al, 2002). Um estudo indica que este processo de transporte do GR em células progenitoras neurais pode ser regulado por uma proteína associada a microtúbulos tecido-específica, a DCL (*doublecortin-like*) (Fitzsimons et al, 2008). Os GRs ativados também participam da indução de apoptose, em um mecanismo ainda pouco elucidado. Estudos sugerem que muitos efeitos dos glicocorticóides podem ocorrer através da alteração do equilíbrio entre fatores pró-sobrevivência e pró-apoptóticos, levando à morte celular (Schaff e Cidlowski, 2002; Greenstein et al, 2002).

Vários estudos têm demonstrado que os neurônios do córtex frontal e do hipocampo sofrem os efeitos deletérios do estresse (Donohue et al, 2006; Magarinos et al, 1997; McLaughlin et al, 2005; Radley et al, 2006; Watanabe et al, 1992), apresentando alterações dos espinhos dendríticos, remodelamento estrutural da conectividade sináptica e alterações no conteúdo de sinaptofisina e espinofilina, proteínas presentes nos espinhos dendríticos (Khurana e Devaud, 2007; Ryan et al, 2005). Acredita-se que o estresse crônico possa levar a processos semelhantes ao envelhecimento no hipocampo (Nichols et al, 2001; Vasconcelos et al, 2003).

1.2. Cafeína

A cafeína (3,7 diidro-1,3,7 trimetil-1H-purina-2,6 diona) presente em grãos de café, folhas de chá e noz de cola, é a droga psicoativa mais consumida no mundo ocidental, onde o seu consumo médio é de 200 mg/dia (Eteng et al, 1997). A ação primária da cafeína é bloquear os receptores de adenosina, o que leva a importantes efeitos secundários relacionados a várias classes de neurotransmissores, incluindo noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, glutamato e GABA (Fredholm et al, 1999). A adenosina atua como um neuromodulador (promove ou inibe a liberação de outros neurotransmissores) e tem sua concentração extracelular aumentada em condições nocivas (e.g., estresse). Receptores de adenosina A_1 e A_{2A} apresentam ações parcialmente opostas em termos de inibição/ativação celular, respectivamente (Fredholm et al, 1999). A ativação de receptores A_1 (inibe a liberação de vários neurotransmissores) confere neuroproteção contra estimulação aguda nociva ao cérebro (Cunha et al, 2006) e a ativação de receptores tipo A_2 pode levar à lesão neuronal (Cunha, 2005). O bloqueio dos receptores A_{2A} parece estar principalmente envolvido com os efeitos neuroprotetores da cafeína, visto que a prevenção dos déficits de memória pela cafeína é simulada por antagonistas dos receptores A_{2A} e não dos A_1 (Prediger et al, 2005; Dall'Igna et al, 2007). Além disso, o consumo crônico de cafeína ou de antagonistas dos receptores A_{2A} são capazes de prevenir os déficits de memória e concomitante sinaptotoxicidade em ratos adultos submetidos a um único episódio de convulsões induzidas por ácido kaínico no início da vida (Cognato et al, 2010).

Estudos epidemiológicos demonstram que portadores da doença de Alzheimer e doença de Parkinson consumiam menos café que os controles da mesma idade sem estas doenças (Hancock et al, 2007; Maia e de Mendonça, 2002). A cafeína também

apresenta efeitos protetores em modelos de doença de Parkinson e doença de Alzheimer em ratos e camundongos (Aguilar et al, 2006; Dall'Igna et al, 2004). O mecanismo de neuroproteção do consumo crônico de cafeína ainda não está esclarecido, alguns autores acreditam que seja devido à diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios (Kalda et al, 2006), porém uma *upregulation* nos receptores A₁, cuja ativação pode significar neuroproteção ou um aumento das defesas antioxidantes (Cunha et al, 2006), poderia ser um mecanismo alternativo. A cafeína via inibição de receptores do tipo A₁ também afeta a liberação de vários outros neurotransmissores como a acetilcolina, a dopamina e a serotonina (Fredholm et al, 1999).

Alguns destes efeitos da cafeína são agudos, sendo suprimidos após uma administração crônica de cafeína, como, por exemplo, a liberação de dopamina em núcleo accumbens e córtex pré-frontal (Acquas et al, 2002; Quarta, 2004). Já outros, como a liberação de acetilcolina em núcleo accumbens e córtex frontal induzido pela administração de cafeína, continuam ocorrendo mesmo após um tratamento crônico com a cafeína, demonstrando que parece não haver desenvolvimento de tolerância para estes efeitos (Aguas et al, 2002). É importante salientar também que a cafeína pode ter efeitos opostos conforme o uso seja agudo ou crônico devido a um aumento ou diminuição dos receptores de adenosina que poderá afetar toda neurotransmissão, uma vez que a adenosina é um neuromodulador (Fredholm et al, 1999).

Além de atuar sobre os receptores de adenosina, a cafeína também promove a liberação de cálcio de estoques intercelulares, o que tem sido demonstrado levar ao aumento do número de mitocôndrias em cultura de fibras musculares (McConell et al, 2010). Além disso, o tratamento agudo com cafeína estimula a expressão da citocromo oxidase (uma enzima da cadeia respiratória) em estriado de ratos machos, sendo que

esse efeito não foi verificado em fêmeas (Jones et al, 2008). Recentemente outros estudos também demonstraram que a cafeína pode ter efeitos sexo-específicos. Lorenzo e colaboradores (2010) demonstraram que a administração de cafeína à mãe altera os receptores de adenosina do tipo A_1 nos filhotes machos e não nas fêmeas. Estudos de nosso grupo demonstraram que a cafeína diminui o consumo de alimento doce e aumenta a ansiedade em machos, mas não em fêmeas (Pettenuzzo et al, 2008; Noschang et al, 2009).

A cafeína pode também estar relacionada com a resposta ao estresse e em condições que afetam o sistema nervoso central, como doenças neurodegenerativas, onde os glicocorticóides desempenham um papel chave (Swaab et al., 2005; Bao et al., 2008; Zunszain et al., 2010). Em um estudo realizado em cultura de osteoblastos foi observado que a cafeína potencializa a atividade transcricional dos GRs (Föcking et al, 2005).

1.3. Mitocôndria

A mitocôndria é uma organela de extrema importância na célula, onde desempenha um papel fundamental na morte celular, dinâmica do cálcio e na geração de energia e radicais livres. As mitocôndrias são organelas móveis e dinâmicas. Estudos sugerem que mitocôndrias presentes em diferentes tipos ou subcompartimentos celulares diferem em sua função, morfologia, e outras propriedades, permitindo que sejam divididas em múltiplos subgrupos. Nos neurônios, por exemplo, estão presentes as mitocôndrias sinápticas e não sinápticas. O acúmulo de mitocôndrias nas sinapses depende do transporte mitocondrial do soma até os terminais neuronais, onde exerce um importante papel na geração de energia para o transporte de vesículas de neurotransmissores para a membrana sináptica (Du et al,

2012). É importante lembrar que a mitocôndria é essencial para a função neuronal devido à capacidade glicolítica limitada dos neurônios, que os deixa altamente dependentes da fosforilação oxidativa para suprir suas necessidades energéticas (Moreira et al, 2010). Seu funcionamento normal também é crítico para o tecido cerebral, uma vez que essa organela controla vias de apoptose, dinâmica de cálcio e geração de energia. Além disso, a mitocôndria é uma fonte importante de radicais livres na célula. A cadeia transportadora de elétrons produz uma pequena quantidade de radicais livres durante seu funcionamento normal, porém essa quantidade é aumentada se houver alterações, como, por exemplo, inibição na atividade de complexos da cadeia transportadora de elétrons (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A cadeia transportadora de elétrons é constituída por cinco complexos por onde os elétrons fluem, gerando força próton motriz para a produção final de ATP. Cada complexo possui inibidores específicos que atuam prevenindo a passagem dos elétrons, ao se ligarem a um componente da cadeia, interferindo assim na função mitocondrial e na síntese de ATP (Foster et al, 2006). O complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase) da cadeia respiratória catalisa o primeiro estágio da fosforilação oxidativa, a oxidação do NADH pela ubiquinona, acoplando esta reação com o transporte ativo de prótons através da membrana mitocondrial (Brandt, 2006). A rotenona é um potente inibidor natural do complexo I e bloqueia este complexo perto do sítio de ligação da ubiquinona devido à sua similaridade estrutural com esta (Darrouzet et al, 1998; Degli Esposti, 1998). O complexo II (Succinato: ubiquinona oxidoreductase) catalisa a oxidação do succinato a fumarato no ciclo do ácido cítrico e doa os elétrons à quinona na membrana (Hägerhäll, 1997). O ácido 3-nitropropiónico (3-NPA) é um análogo ao succinato que inibe a atividade enzimática do complexo II (Foster et al, 2006). O complexo III (citocromo bc_1) catalisa a transferência de elétrons

do ubiquinol ao citocromo c, que é acoplado a translocação de prótons (Foster et al, 2006). A antimicina A é um inibidor potente do complexo III e age inibindo a transferência de elétrons da semiquinona para o sítio Q_I aumentando a formação de semiquinona (Chen et al, 2003). O complexo IV (citocromo c oxidase) doa elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular produzindo água (Babcock, 1999). O complexo IV é inibido pelo cianeto porque este reage com a forma férrica da heme a₃ bloqueando a transferência de elétrons do complexo IV ao oxigênio molecular (Foster et al, 2006).

A mitocôndria também está envolvida na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e doença de Alzheimer (Moreira et al, 2010). Por exemplo, a superprodução de placas β -amilóides está associada com alterações na dinâmica mitocondrial incluindo morfologia, distribuição e função via modulação diferencial de proteínas de fusão/fissão mitocondrial (Manczak et al, 2006; Wang et al, 2008). A constante fusão/fissão mitocondrial regula a densidade e morfologia dessa organela e está intimamente relacionada com a sua função (Du et al, 2012). Além disso, a doença de Alzheimer também é associada com dano sináptico, um forte indicador inicial dos sintomas clínicos da doença, levando à perda progressiva de memória e déficit cognitivo. O mecanismo pelo qual ocorre a perda sináptica ainda é desconhecido, mas há fortes indicativos de que exista um envolvimento mitocondrial neste processo (Reddy e Beal, 2008; Reddy et al, 2010). Um estudo conduzido por Calkins e colaboradores (2011) mostrou que cultura de neurônios, na presença de placas β -amilóides, apresentaram redução em seus constituintes sinápticos e alterações na dinâmica mitocondrial, com redução do transporte mitocondrial nos axônios e aumento na fissão mitocondrial. Estas alterações que ocorreram devido ao acúmulo de placas β -amilóides nas sinapses e nas

mitocôndrias levaram as células cultivadas à morte celular por apoptose. Na doença de Parkinson, por sua vez, a morte dos neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra* também pode ser associada com a presença de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Evidências sugerem que a presença de depósitos de α -sinucleína nas mitocôndrias da *substantia nigra* de pacientes portadores da doença de Parkinson podem estar relacionados com a redução da atividade do complexo I e aumento de estresse oxidativo observado nestes pacientes (Devi et al, 2008). Além disso, esta redução na atividade do complexo I observada em pacientes com doença de Parkinson (Shapira, 1990) é reproduzida por MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), ou rotenona, por exemplo, em modelos animais desta doença.

Recentemente tem sido demonstrado o envolvimento dos receptores de glicocorticóides com a biogênese mitocondrial (Simpkins et al, 2010). O mecanismo de ação dos glicocorticóides sobre as células ainda está sendo investigado, mas se acredita que um dos mecanismos de ação seja através da ativação de genes, como por exemplo, alguns genes nucleares que transcrevem proteínas mitocondriais (Menezes-Ferreira e Torresani, 1983). Estudos têm demonstrado que o GR ativado transloca para a mitocôndria, além da bem caracterizada translocação para o núcleo (Demonacos et al, 1993; Scheller et al, 2000; Moutsatsou et al, 2001; Scheller et al, 2003). Porém essa translocação para a mitocôndria parece mais relacionada com a apoptose do que com biogênese mitocondrial (Sionov et al, 2006) Nesse sentido, os glicocorticóides atuam sobre a dinâmica mitocondrial e a função celular através de efeitos bifásicos, onde baixas doses apresentam efeitos neuroprotetores, potencializando a plasticidade neuronal e altas doses potencializam a ação de agentes tóxicos em neurônios corticais (Du et al, 2008). Esta relação de “curva em U” invertido entre os níveis de glicocorticóides significa que baixas concentrações de glicocorticóides exibem ações

tróficas nas ramificações neuronais enquanto altas doses são prejudiciais à sobrevivência neuronal (Du et al, 2008). Nesse sentido, a adaptação individual do animal ao estresse é que vai determinar em que ponto da curva aquele determinado animal está e os consequentes efeitos do estresse no sistema nervoso desse animal.

1.4. Sexo

A maioria dos estudos dos efeitos do estresse e de agentes neuroprotetores foi conduzida em machos. Porém as respostas a esses agentes parecem ser diferentes nas fêmeas.

Em relação ao estresse, as fêmeas apresentam concentração basal de glicocorticóides mais altas do que os machos e também liberam mais corticosterona após um estressor agudo (Bowman et al, 2004; Galea et al, 1997). Um estudo observou que em fêmeas ocorre uma potencialização da ativação dos neurônios que expressam GRs no núcleo paraventricular hipotalâmico, o que pode indicar uma maior sensibilidade ao *feedback* negativo do eixo HHA, levando a uma redução na sensibilidade a estressores subsequentes a uma primeira exposição. Neste contexto, as fêmeas parecem responder ao estresse de maneira mais eficiente que os machos por ativar seletivamente os GRs (Zavala et al, 2010). As respostas comportamentais após o estresse crônico também parecem ser diferentes nas fêmeas, nas quais a exposição ao estresse leva a um melhor desempenho em tarefas cognitivas (Luine et al, 2007). Além disso, um estudo demonstra que o padrão de ativação cerebral e as adaptações sinápticas decorrentes da exposição ao estresse diferem entre machos e fêmeas, o que parece contribuir para as diferenças comportamentais observadas (Khurana e Devaud, 2007).

O mecanismo responsável pelas diferentes respostas de fêmeas ao estresse ainda não está bem elucidado, mas as interações entre o estradiol e os glicocorticóides podem estar envolvidas nestes efeitos. A ação dos glicocorticóides é oposta à ação do estrogênio em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos. Na resposta ao estresse, por exemplo, o tratamento com estrogênio está associado com aumento nos níveis de corticosterona circulantes, enquanto os glicocorticóides promovem uma *downregulation* na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal para reduzir estes altos níveis de glicocorticóides circulantes. O estrogênio parece estimular a transcrição de genes que são inibidos por glicocorticóides através de um mesmo elemento de resposta consenso AP-1 (Uht et al, 1997). Por outro lado, os estrógenos também aumentam a transcrição das enzimas mitocondriais (Brinton, 2008). Por exemplo, os estrogênios promovem uma *upregulation* da expressão das enzimas que atuam na mitocôndria exercendo efeitos antioxidantes, como a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase. Nas fêmeas jovens, o efeito do estradiol leva a um aumento na atividade destas enzimas promovendo uma menor liberação de peróxidos da mitocôndria e, assim, protegendo contra o estresse oxidativo (Borrás et al, 2005). Já em um estudo realizado em ratas idosas, a produção mitocondrial de peróxidos foi maior que a observada em machos, mostrando que as fêmeas idosas são mais susceptíveis que os machos a doenças relacionadas à mitocôndria, como a doença de Alzheimer (Lloret et al, 2008).

Em relação à cafeína, a forte correlação negativa que existe entre consumo crônico de cafeína e desenvolvimento de doença de Parkinson é observada consistentemente em homens, mas não em mulheres. De modo geral, não houve uma relação clara entre consumo de cafeína e diminuição da incidência de doença de Parkinson em mulheres nos dois grandes estudos conduzidos em populações de

mulheres (Ascherio et al, 2001 e 2004). Outros estudos, mais tarde demonstraram que essa perda de efeito neuroprotetor da cafeína estava relacionada com a presença de estrógenos, onde apesar de apresentarem efeitos neuroprotetores *per se*, os estrógenos foram capazes de inibir os efeitos neuroprotetores da cafeína (Ascherio et al 2004; Simon et al, 2009, Costa et al, 2010). Os mecanismos de como os estrógenos inibem os efeitos neuroprotetores da cafeína ainda não são claros.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da exposição ao estresse crônico e/ou administração crônica de cafeína na atividade da cadeia respiratória de hipocampo, córtex e estriado e no conteúdo de sinaptofisina e MAP2 em hipocampo de ratos machos e fêmeas.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar a atividade da cadeia transportadora de elétrons em homogeneizado de tecido cerebral (córtex estriado e hipocampo) de ratos machos e fêmeas estressados cronicamente e tratados cronicamente com cafeína.

2.2.2. Verificar se as enzimas da cadeia transportadora de elétrons nesses animais tratados apresentavam sensibilidade diferente a inibidores clássicos da cadeia respiratória.

2.2.3. Verificar o conteúdo de sinaptofisina e MAP2 em fatias de hipocampo desses ratos machos e fêmeas estressados cronicamente e tratados cronicamente com cafeína.

3. MATERIAIS E MÉTODOS E RESULTADOS

Os materiais e métodos e os resultados desta dissertação estão apresentados a seguir, da seguinte forma:

- Capítulo 1 – Artigo submetido à revista Stress;
- Capítulo 2 – Materiais e métodos e resultados adicionais.

3.1. Capítulo 1 – Artigo submetido à revista Stress;

Sex- specific effects of chronic administration of caffeine and stress in mitochondria of rat brain.

Artigo submetido para publicação na revista Stress.

**SEX- SPECIFIC EFFECTS OF CHRONIC ADMINISTRATION OF
CAFFEINE AND STRESS IN MITOCHONDRIA OF RAT BRAIN**

Carina S. Mota^a, Simone N. Weis^a, Rachel Krolow^a, Carla Dalmaz^a, Leticia F.
Pettenuzzo^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brazil

21 pages

4 figures

Mailing address:

Carina de Souza Mota, Depto de Bioquímica, Instituto de Ciências Básica da
Saúde, UFRGS, Ramiro Barcellos, 2600, anexo. 90035-003 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone/FAX: 0055-051 33085540.

E-mail: carina.mota@gmail.com (C.S. Mota)

Abstract

Studies indicate that acute caffeine and stress can increase the expression of cytochrome oxidase, a mitochondrial protein. Since mitochondrial alteration can be associated with neurodegenerative disorders, the aim of the present study was to verify the effect of these factors chronically in mitochondrial parameters in hippocampus, cortex and striatum of male and female rats. We found that stress can cause sex and structure-specific alteration in mitochondrial parameters analyzed in this study and that caffeine leads to small changes in these parameters that do not justify the caffeine neuroprotective effect.

Keywords: caffeine, chronic restraint stress, electron transport chain activity, mitochondrial mass, respiratory chain inhibitors, sex-specific.

Abbreviations:

GR: Glucocorticoid receptor

MR: Mineralocorticoid receptor

GC: Glucocorticoid

ROS: Reactive Oxygen Species

AD: Alzheimer's disease

3-NPA: 3-Nitropropionic Acid

KCN: Potassium Cyanide

1. INTRODUCTION

Caffeine is the most widely consumed stimulant in the world and is present in a number of dietary sources consumed worldwide, i.e., tea, cocoa beverages, chocolate bars and soft drinks (Fredholm, 1999). Several lines of evidence suggest that caffeine can exert protective effects in neurotoxicity experimental models due to its adenosine A₁ and A_{2A} receptors antagonist properties (Chen et al., 2001; Kachroo et al., 2010; Gomes et al., 2011). Diminution of excitatory aminoacids release (Kalda et al, 2006), increase of antioxidant defenses (Cunha et al, 2006) and increased expression of P450 or cytochrome oxidase (Chen and Chern, 2011) could also contribute to neuroprotective mechanisms elicited by caffeine. Besides, caffeine, at least in osteoblasts, can potentiate the glucocorticoid receptor (GR) transcriptional activity (Föcking et al., 2005). Glucocorticoids (GC) play a key role in conditions affecting the central nervous system such neurodegenerative disorders and stress (Swaab et al., 2005; Bao et al., 2008; Zunszain et al., 2010).

Stress may be defined as behavioral and psychological modifications in response to threats to the homeostasis (Johnson et al., 1992). Restraint stress induces both oxidative and psychological stress, being the most preferred means of stressing animals, since it is simple, painless and without lasting debilitation (Buynitsky and Mostofsky, 2009). A previous experimental study demonstrated that chronic restraint stress is involved with reactive oxygen species (ROS) generation and these can be related to cognitive deficits (Liu et al., 1996). Researchers have reported that the immobilization stress produces hippocampal and cortical damage leading to adverse consequences on brain function which can progress to mental disorders (Yun et al., 2001; Lee et al., 2006). In addition, GR levels are down regulated and its

immunoreactivity is reduced in hippocampus following restraint stress in male rats (Kitraki et al., 2004; Wright et al., 2006).

Most studies on stress effects were conducted in males but the response and the adaptation to stress in females appear to be different. Females have higher basal and stress-induced plasmatic corticosterone levels and also need a longer period to raise its levels than male rats in response to stress. In addition, hippocampal GRs are decreased in males and increased in females following chronic stress (Buynitsky and Mostofsky, 2009).

The respiratory chain system consists of five membrane protein complexes (I to V), and produces most of the energy in eukaryotic cells (Saraste, 1999). Abnormalities of mitochondrial respiratory chain have been identified in several neurodegenerative disorders and the locus of these defects probably varies according to the pathogenic mechanisms involved in each disorder. In Parkinson's disease there is evidence for a specific complex I deficiency in substantia nigra. In Huntington disease there is evidence for a severe defect of complex II/III activity, a mild reduction in complex IV activity and a severe deficiency of aconitase. In Alzheimer's disease (AD) there is evidence for cytochrome oxidase deficiency that seems to be parallel to the pathology in the brain, at least in terms of distribution. In Wilson disease there is evidence of a severe liver defect of complexes I, II, III and aconitase (Schapira, 2002). There are evidences of relationship between loss of mitochondrial mass and neurodegenerative diseases. In fact, a *postmortem* study shown that fluorescence levels of MitoTracker Green was reduced in brains with AD neurodegeneration (de La Monte et al., 2000), suggesting reduced mitochondrial mass. Estradiol also has a neuroprotective effects against brain insults associated with AD due to prevention of mitochondrial dysfunction, by maintaining the mitochondrial calcium homeostasis

(Nilsen and Brinton, 2002). On the other hand, GC may be involved with the expression of mitochondrial proteins and thus in the mitochondrial oxidative metabolism (Demonacos et al, 1995; Fujita et al, 2009).

Considering the data introduced above, and considering that stress is frequently associated with caffeine consumption, the aim of the present study was to verify the interaction between chronic stress and chronic caffeine administration in the respiratory chain complexes activities in hippocampus, cortex and striatum of male and female rats. These structures were chosen because present significant density of adenosine and glucocorticoid receptors and are related to the neurodegenerative disorders. We also evaluated *in vitro* effects of classic respiratory chain inhibitors in the same brain structures used in the chronically-treated animals study to verify if any treatment could modify the inhibitor's effect.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

Twenty-four adult male (60-120 days at the beginning of the treatment, weighing 150–230 g) and twenty-four adult female (60-120 days at the beginning of the treatment, weighing 140–200 g) Wistar rats were used. Experimental animals were housed in groups of 4 in Plexiglas home cages (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust and maintained on a standard dark-light cycle (lights on between 7:00 and 19:00 h), at a room temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. The rats had free access to food (standard lab rat chow) and water, except during the periods when restraint stress were applied. All studies were in accordance with the Institutional Ethical Committee and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal

Science (ICLAS) and of the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology.

2.2. Restraint Stress Protocol

The animals were divided in two groups: control group, receiving tap water and caffeine group, receiving caffeine (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) at dose of 1.0 g/L in drinking water as the only source of water during entire experimental period (Gasior et al, 2000). These groups were subdivided in non-stressed and stressed groups (repeated restraint stress during 40 days). The final groups were: control (non-stressed receiving water), caffeine (non-stressed receiving caffeine 1.0 g/L), stressed (stressed receiving water) and stressed + caffeine (stressed receiving caffeine 1.0 g/L), resulting in four groups. The stressed group was taken to a different room, where restraint was applied by placing the animal in a 25 x 7 cm plastic tube, and fixing it with plaster tape on the outside so that the animal was unable to move. There was a 1.5 cm hole at one far end for breathing. The restraint procedure was performed between 11:00 and 14:00 h. The animals were stressed for 1 h/day, 5 days a week for 40 days. Control animals were kept undisturbed in their home cages.

2.3. Tissue preparation

The animals were killed by decapitation 24h after the last restraint session. The brains were quickly removed and the hippocampus, striatum and cerebral cortex were dissected out on ice. The structures were weighed and homogenized with a Teflon-glass homogenizer in 20 vol (w/v) SET buffer (250mM sucrose, 2mM EDTA, 10mM Trizma base), pH 7.4. The homogenates were centrifuged 800 x g for 10 min and the supernatants were used for determination of mitochondrial respiratory chain enzyme

activities (complexes I-III, II and IV). Protein measurements were carried out as described by Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

2.4. Mitochondrial respiratory chain enzyme activity determination

In the day of the experimental assays, homogenates were freeze-dried and thawed three times to break the membranes and fully expose the enzymes to substrates. The activities of the electron transport chain complexes II, I-III and IV were determined in homogenates according to standard methods previously described in the literature (Fischer et al., 1985; Schapira et al., 1990; Rustin et al., 1994; Pettenuzzo et al., 2006).

The activity of respiratory chain enzyme complex succinate: DCIP oxidoreductase (complex II) was determined using a modification of the method of Fischer et al. (1985) by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm ($\epsilon = 19.1/\text{mM cm}$). The reaction medium consisting of 44mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, 20mM sodium succinate and 9.5 μM DCIP. It was preincubated with 40–80 μg homogenate protein (striatum, hippocampus or cortex) at 30°C for 20 min. Subsequently, 5 mM sodium azide and 8 μM rotenone were added, and the reaction was initiated by addition of 45 μM DCIP and was monitored for 5 min.

Complex I-III activity was measured by following the increase in absorbance due to reduction of cytochrome *c* at 550 nm ($\epsilon = 21/\text{mM cm}$), according to Schapira et al (1990) with some modifications. The reaction mixture contained 14mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, 2 mM KCN, 9.2 μM EDTA, 46.5 μM cytochrome *c* and 10–20 μg homogenate protein (striatum, hippocampus and cortex). The reaction was initiated by adding 23 μM NADH and was monitored at 25°C for 3 min before addition of 7.5 μM rotenone, after which the activity was measured for an additional 3

min. Complex I–III activity was the rotenone sensitive NADH: cytochrome *c* reductase activity.

The activity of cytochrome *c* oxidase (complex IV) was assayed according to the method described by Rustin et al. (1994) with modifications, by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome *c* at 550 nm ($\epsilon = 19.1/\text{mM cm}$). The reaction mixture contained 11 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.75mM n-dodecyl- β -D -maltoside, 2–4 μg homogenate protein and the reaction was initiated with addition of 0.7 mg reduced cytochrome *c*. The activity of complex IV was measured at 25°C for 10 min.

Separately, the activity of the respiratory chain enzyme complexes was determined in the presence of the following inhibitors: 0.5 μM rotenone (complex I—NADH:ubiquinone oxidoreductase), 1 mM 3-nitropropionic acid (3-NPA; complex II—succinate dehydrogenase), 10 μM antimycin A (complex III—ubiquinone:cytochrome *c* oxidoreductase) and 4 μM potassium cyanide (KCN; complex IV—cytochrome oxidase). These were the inhibitor concentrations able to generate around a 50% inhibition of the enzyme activity in controls. This percentage of inhibition was chosen because it can lead a margin of a measurable alteration caused by the chronic caffeine and/or stress treatment in the enzyme sensitivity to the inhibitor. The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were expressed as nmol/min.mg protein, and the activities evaluated in the inhibitor presence was expressed as % of inhibition.

2.5. Preparation of samples for flow cytometry

To evaluate the mitochondrial mass, the samples were prepared for flow cytometry according to Fischer and Reichmann (2001) with modifications. Briefly,

rats were anesthetized with chloral hydrate (30%, 10 ml/Kg, i.p.; Vetec, Brazil) and perfused with a peristaltic pump (Control Company, São Paulo, Brazil, flow 20 ml/min) with 200 ml of 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Brains were then removed and the structures (hippocampus, cortex and striatum) were dissected carefully. Cell suspensions were obtained by dissociation of samples with PBS containing 250 ug/ml collagenase Type IV (C5138) (Sigma-Aldrich), to yield digestion. The cell suspensions were passed through a cell filter strainer with 40 um nylon meshes (Becton-Dickison) into a sterile 50 mL Falcon tubes (Becton-Dickison). The resulting filtrate was immediately used to flow cytometric analysis.

2.6. Flow cytometry protocol

Cells of the filtrate were stained with Mitotracker Green FM (Invitrogen) according to method described by Weis and colleagues (2011). The data analysis was performed using the FlowJo software and all flow cytometric acquisitions and analyses were performed using CELLQuest Pro data acquisition (BD Biosciences).

2.7. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.D. and were analyzed by two-way ANOVA (using stress and caffeine as factors) or three-way ANOVA (using stress, caffeine and gender as factors), as indicated. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All tests were performed using the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software.

3. RESULTS

3.1. Effect of chronic restraint stress and chronic caffeine administration on the mitochondrial complexes in the striatum of male and female rats

Analysis of mitochondrial enzyme parameters in striatum is shown in figure 1. At complex II an interaction between stress and sex was observed in which stress increased the activity of complex II in females and decreased in male rats (Fig. 1A). A sex main effect was also demonstrated with increased complex activity in females (Fig. 1A). Stress, caffeine and sex main effects were observed at complex II inhibition by 3-NPA (Fig. 1B) (Three-way ANOVA).

Chronic restraint stress increased complex IV activity (Fig. 1C). A stress x caffeine interaction was found in female rats with caffeine alone decreasing enzyme activity and in association with stress, complex activity back to control levels (Fig. 1C). Sex main effect was demonstrated with complex IV activity higher in males than in female rats (Fig. 1C). Consistent with this, inhibition of this complex by KCN was higher in female than male rats (Fig. 1D) (Three-way ANOVA).

The complex I-III activity was increased by stress (Fig. 1E) and this effect was more pronounced in females. Regarding complex I inhibition by rotenone, female rats showed higher inhibition than males (Fig. 1F). Complex III inhibition by antimycin (Fig. 1G) showed an interaction between stress and caffeine, in which these factors individually decreased inhibition and when combined they increased inhibition in both female and male rats (Three-way ANOVA).

[FIGURE 1]

3.2. Effect of chronic restraint stress and chronic caffeine administration on the mitochondrial complexes in the hippocampus of male and female rats

Three-way ANOVA demonstrated a significant sex effect on the complex II activity (Fig. 2A), in which females had a higher enzyme activity compared with male rats. The same sex main effect was observed in the percentage of complex II inhibition by 3-NPA (Fig. 2B), with female rats presenting greater enzymatic inhibition than males.

Regarding complex IV activity it was observed that male rats had higher enzyme activity than females (Fig. 2C). There was a significant effect of sex in the inhibition of complex IV by KCN (Fig. 2D) since the inhibitor had higher effects in females (Three-way ANOVA).

There was an interaction between caffeine and stress in complex I-III activity (Fig. 2E), since when the two factors are combined the complex activity was at the control levels. In relation to inhibition of complex I-III by rotenone (Fig. 2F) there was a significant effect of sex, in which females had greater enzymatic inhibition than male rats. There were no significant effects observed in the inhibition of the complex by antimycin (Fig. 2G) (Three-way ANOVA).

[FIGURE 2]

3.3. Effect of chronic restraint stress and chronic caffeine administration in the mitochondrial complexes in the cortex of male and female rats

Analyzing the complex II results in the cortex, we observed an interaction between chronic restraint stress and chronic administration of caffeine, in which stress and caffeine alone increased the complex II activity and when combined the activity

was at control levels (Fig. 3A). Also, an interaction between stress and sex was observed because only females were affected by stress. The inhibition of complex II by 3-NPA was stronger in females than in males (Fig. 3B) (Three-way ANOVA).

In the complex IV activity we observed an interaction between stress and sex with female rats presenting increased and males decreased complex activities (Fig. 3C). In general male rats had higher overall complex IV activity than females. There were no significant effects on percentage inhibition of complex IV by KCN (Fig. 3D) (Three-way ANOVA).

Three-way ANOVA revealed that stress induced an increase in the complex I-III activity that was more pronounced in males. A sex main effect was also seen in which males had an overall activity higher than females (Fig. 3E). The inhibition induced by rotenone was higher in females than in male rats (Fig. 3F). It was also observed a stress and caffeine interaction in the complex I-III inhibition by rotenone (Fig. 3F) in female rats, where the stress or caffeine alone reduced the inhibition whereas when factors are combined, the inhibition is similar to control values. The complex I-III inhibition by antimycin (Fig. 3G) was reduced by stress or caffeine alone and when combined they induced an increase in the inhibition both in males and females (Three-way ANOVA).

[FIGURE 3]

3.4. Effect of chronic restraint stress and chronic caffeine administration on the mitochondrial mass in the striatum, hippocampus and cortex of male and female rats

Analysis of mitochondrial mass presented an interaction between stress and caffeine in striatum of male rats (Fig. 4A) increasing the population with high mitochondrial mass with concomitant reduction in the population with low mitochondrial mass. We also observed a significant effect of stress in female cortex (Fig. 4F), in which a stress-induced increase in the population with high mitochondrial mass accompanied by a reduction of population with low mitochondrial mass was observed. No significant effects were observed in male cortex and hippocampus or in female striatum and hippocampus (Two-way ANOVA).

[FIGURE 4]

4. DISCUSSION

Results show that, in general, chronic stress alone increased striatal activity of mitochondrial complexes in both male and female rats, however regarding complex II, a decreased activity was found only in males. This increase in activity is not accompanied by an increase in mitochondrial mass in females. In males it was observed an increase in mitochondrial mass in striatum, the structure that presented an inhibition in the complex II. Previous study from our research group found that chronic stress increased superoxide dismutase (SOD) activity in striatum of males suggesting an exacerbation of ROS production (Noschang et al., 2009). The reduced complex II activity may lead to enhanced ROS generation (Indo et al., 2007; Liot et al., 2009). On the other hand, there was a pronounced increase in complex IV activity induced by stress in males. This result supports previous one performed in rat glioma cells which demonstrated that in the presence of GC there is an increased cytochrome oxidase-1 expression (Koufali et al., 2003). Taken together these results, it is not

possible to determine if the observed increase in striatal mitochondrial mass is due to an increase of mitochondrial quantity or due to swelling mitochondrial. Mitochondrial biogenesis could takes place since stress or caffeine affected respiratory chain enhancing the expression of nuclear mitochondrial genes (Koufali et al., 2003; Jones et al, 2008). On the other hand, stress, as many apoptosis-inducing compounds could impaired membrane potential leading to the opening of mitochondrial permeability transition pore and therewith swelling. The increased mitochondrial contact surface might explain the increased mitochondrial mass detected in the present study. However, more studies are necessary to clarify how stress and caffeine increases the mitochondrial mass in males and females brain structures.

When caffeine effects were observed, a reduced complex IV activity of females striatum was found in addition to an interaction between caffeine and stress, since stress prevents the caffeine effect. Caffeine, as stress, also reduced complex II activity in male rats. The mechanism of caffeine protective effects has been attributed to adenosine receptors blockade and the striatum is particularly rich in A₁R and A_{2A}R. (Gomes et al, 2011). Caffeine in a single dose can stimulate both expression and activity of cytochrome oxidase (COX) in striatum of male but not female mice, since COX expression of control females shown to be equal when compare to those males treated with a single dose of caffeine (Jones et al, 2008). Classic caffeine effects on COX activity were not observed in this study perhaps because it was administered chronically and as far as we know there are no studies about its chronic effects on mitochondria.

In the hippocampus, complex II activity was higher in females than in male rats; the opposite was observed in the complex IV activity, in which males showed higher activity than female rats. Activity of complex I-III was slightly enhanced by both

caffeine and stress alone. When combined, these two factors reduced the activity at control levels in females and male rats.

The GC actions are mediated by GR and mineralocorticoid receptors (MR). The MRs and GRs binds corticosterone, dimerizes and translocate to the nucleus where they interact with a glucocorticoid-response element and thus act on the transcriptional regulation of specific sets of genes by the MR or GR. This affects cellular function in cells that carry these receptors, such as CA1 hippocampal cells. In the hippocampus of almost all species a co-localization of MR and GR was found (de Kloet et al., 2005). The MR is mostly responsible for the maintenance of the stress-related neural circuits, and is implicated in the appraisal of sensory information and its organization, whereas the GR is important for the normalization of homeostasis and the storage of information in preparation for future use (Zhou et al, 2011). GR is widely expressed in the brain, whereas MR expression is found predominantly in the hippocampus in rodents. Increased forebrain MR expression alters the expression of genes associated with stress and anxiety, leading to a decrease in the hippocampal GR (Rozeboom et al., 2007). The selective hippocampal presence of MR may account for why stress did not markedly affect this cerebral structure in the present study.

At cerebral cortex, males presented higher activity of complexes I-III and IV than females; however stress was able to increase activities of all complexes analyzed in females. Complex II activity was higher in males and females with females presenting a more pronounced effect. Caffeine also increased complex II activity in females, but in the presence of stress the activity was similar to their control levels. The complex IV activity was reduced by stress in males and the opposite effect was observed in females which return back to control levels when combined to caffeine. The chronic stress may have affected the cortex more markedly than hippocampus

since in this structure there are less MR available to induce the GC changes. GC also can regulate the mitochondrial function in an inverted U-shaped dose-dependent curve. GC in low doses can exert neuroprotective effects whereas high doses can increase the susceptibility of cortical neurons to injury (Du et al., 2008). This inverted U-shaped dose-dependent curve is probably related to the occupancy of MR and GR, which are known to present different affinities. In general lines the chronic caffeine and stress increased the respiratory chain activity in females and in males with more pronounced effects in cerebral cortex. The exception is the diminished complex II activity in males provoked by stress and caffeine treatment.

Mitochondrial respiratory complex inhibitors act at target points of the respiratory chain preventing the passage of electrons by binding to a specific component of the chain thus interfering in mitochondrial function and ATP synthesis (Foster et al, 2006). Rotenone is a potent natural inhibitor of the complex I and blocks this complex near the ubiquinone binding site due to their structural similarity to ubiquinone (Darrouzet et al, 1998; DegliEsposti, 1998). Antimycin A is a highly inhibitor of complex III and acts inhibiting the electron transfer from semiquinone to the Q_I site thus increasing the semiquinone formation (Chen et al, 2003). 3-nitropropionate (3-NPA) is a succinate analog that inhibits the enzymatic activity of complex II (Foster et al, 2006) and is used to model neurodegenerative disorders as Huntington disease (Borlongan et al., 1997). The complex IV is inhibited by cyanide because it reacts with the ferric form of heme a_3 blocking the transfer of electrons from complex IV to molecular oxygen (Foster et al, 2006).

The enzymes from female striatum and hippocampus presented greater inhibition in the presence of those classic inhibitors. In the striatum stress and caffeine treatment increased the inhibition at complex II in a more pronounced manner in

females. There was an interaction between stress and caffeine in the inhibition of complex III, since it was more pronounced in male rats.

Female cortex enzymes had a greater inhibition only in the presence of complex I and II inhibitors, without sex differences in complex III and IV inhibition. Stress or caffeine reduced the inhibition of complex I in females or complex III in both sexes, and when combined the inhibition rises at control levels in the same manner as observed in the complex III inhibition in the male striatum. All these data suggest that the stress and caffeine presents variable responses to mitochondrial activity inhibitors and that females seemed to be more susceptible than males to them. It is known that estrogen is a potent neuroprotective agent and it can exert a protective effect, e.g. on cells exposed to 3-NPA (Wang, 2001). The estradiol action depends on estradiol concentration, at micromolar concentrations it prevents ROS formation and at nanomolar levels it blocks the effects of respiratory chain inhibitors (Wang, 2001). These effects were observed in cells incubated acutely with exogenous estrogen. It is possible that during a chronic exposition, e.g., in the female brain, this hormone became necessary to maintain the homeostase of the cells. The tissue is homogenized 1:20 to perform the enzymatic assay, this procedure dilutes the basal estrogen, than it is possible that this diminished estrogen concentration may cause an alteration in the mitochondrial protection.

5. CONCLUSION

The present study demonstrated that chronic stress can cause sex-specific and structure-specific changes in the mitochondrial respiratory chain complexes. Surprisingly the brain structure richest in GC showed the less effect than expected. It is possible that the process of adaptation to stress may have lead to preservation of

mitochondrial function. More studies are needed to elucidate how stress affects male and female rats differently.

The fewer changes caused by chronic treatment with caffeine on the mitochondrial respiratory chain and mass found in the present study do not justify the neuroprotective effect of this drug. Further studies are needed to clarify the neuroprotective mechanism of caffeine front of classical respiratory chain inhibitors.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

Bao AM, Meynen G, Swaab DF. 2008. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res. Rev.* **57**, 531–553.

Borlongan CV, Koutouzis TK, Sanberg PR. 1997. 3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**, 289-293.

Buynitsky T, Mostofsky DI. 2009. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **33**, 1089-1098.

Chen JF, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, Beilstein M, Sonsalla PK, Castagnoli K, Castagnoli N, Schwarzschild MA. 2001. Neuroprotection by caffeine and A(2A)

adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **21**, RC143 1–6.

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

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* **278**, 36027–36031

Cunha GMA, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA. 2006. Increased density and synapto-protective effect of adenosine A2A receptors upon sub-chronic restraint stress. *Neuroscience* **141**, 1775-1781.

Darrouzet E, Issartel JP, Lunardi J, Dupis A. 1998. The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone related inhibitors. *FEBS Lett.* **431**, 34–38.

deKloet ER, Joels M, Holsboer F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 463–475.

de la Monte SM, Luong T, Neely TR, Robinson D, Wands JR. 2000. Mitochondrial DNA damage as a mechanism of cell loss in Alzheimer's disease. *Lab. Invest.* **80**, 1323–1335.

DegliEsposti M. 1998. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 222-235.

Demonacos C, Djordjevic-Markovic R, Tsawdaroglou N, Sekeris CE. 1995. The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: the interaction of the glucocorticoid receptor with mitochondrial DNA sequences showing partial similarity to the nuclear glucocorticoid responsive elements. *J. Steroid Biochem.* **55**, 43–55.

Du J, Wang Y, Hunter R, Wei Y, Blumenthal R, Falke C, Khairova R, Zhou R, Yuan P, Machado-Vieira R, McEwen BS, Manji HK. 2009. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *PNAS.* **106**, 3543–3548.

Fischer HG, Reichmann G. 2001. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J. Immunol.* **166**, 2717-2726.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. 1985. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta* **153**, 23-26.

Föcking M, Schmiegelt D, Trapp T. 2005. Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 435–439.

Foster KA, Galeffi F, Gerich FJ, Turner DA, Müller M. 2006. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* **79**, 136-171.

Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* **51**, 83–133.

Fujita C, Ichikawa F, Teratani T, Murakami G, Okada T, Shinohara M, Kawato S, Ohta Y. 2009. Direct effects of corticosterone on ATP production by mitochondria from immortalized hypothalamic GT1-7 neurons. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **117**, 50–55.

Gasior M, Jaszyna M, Peters J, Goldberg SR. 2000. Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 1101-1111.

Gomes CV, Kaster MP, Tomé AR, Agostinho PM, Cunha RA. 2011. Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. *B.B.A. – Biomembranes* **1808**, 1380-1399.

Indo HP, Davidson M, Yen HC, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa T, Majima HJ. 2007. Evidence of ROS generation by mitochondria in

cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* **7**, 106–118.

Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. 1992. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **16**, 115-130.

Jones FS, Jing J, Stonehouse AH, Stevens A, Edelman GM. 2008. Caffeine Stimulates Cytochrome Oxidase Expression and Activity in the Striatum in a Sexually Dimorphic Manner. *Mol. Pharmacol.* **74**, 673-684.

Kachroo A, Irizarry MC, Schwarzschild MA. 2010. Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. *Exp. Neurol.* **223**, 657–661.

Kalda A, Yu L, Oztas E, Chen JF. 2006. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **248**, 9-15.

Kitraki E, Kremmyda O, Youlatos D, Alexis M, Kittas C. 2004. Spatial performance and corticosteroid receptor status in the 21-day restraint stress paradigm. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1018**, 323-327.

Koufali MM, Moutsatsou P, Sekeris CE, Breen KC. 2003. The dynamic localization of the glucocorticoid receptor in rat C6 glioma cell mitochondria. *Mol. Cell Endocrinol.* **209**, 51-60.

Lee YJ, Choi B, Lee EH, ChoiKS, Sohn S. 2006. Immobilization stress induces cell death through production of reactive oxygen species in the mouse cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **392**, 27–31.

Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E. 2009. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ.* **16**, 899–909.

Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN. 1996. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *Faseb J.* **10**, 1532–1538.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Nilsen J, Brinton RD, 2002. Impact of progestins on estradiol potentiation of the glutamate calcium response. *Neuroreport.* **13**, 825–830.

Noschang CG, Krolow R, Pettenuzzo LF, Avila MC, Fachin A, Arcego D, von PozzerToigo E, Crema LM, Diehl LA, Vendite D, Dalmaz C. 2009. Interactions

between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidant system. *Neurochem. Res.* **34**, 1568-1574.

Pettenuzzo LF, Ferreira GD, Schmidt AL, Dutra CS, Wyse ATS, Wajner M. 2006. Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. *Int. J. Dev. Neurosci.* **24**, 45-52.

Rozeboom AM, Akil H, Seasholtz AF. 2001. Mineralocorticoid receptor overexpression in forebrain decreases anxiety-like behavior and alters the stress response in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 4688–4693.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* **228**, 35–51.

Saraste M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**, 1488-1493.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. 1990. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **54**, 823–827.

Schapira AHV. 2002. Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 7–14.

Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. 2005. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res. Rev.* **4**, 141–194.

Yun SJ, Park HJ, Yeom MJ, Hahm DH, Lee HJ, Lee EH. 2002. Effect of electroacupuncture on the stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **318**, 85–88.

Weis SN, Pettenuzzo LF, Krolow R, Valentim LM, Mota CS, Dalmaz C, Wyse ATS, Netto CA. 2011. Neonatal hypoxia ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion*, doi:10.1016/j.mito.2011.10.002.

Wright RL, Lightner EN, Harman JS, Meijer OC, Conrad CD. 2006. Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 595-605.

Zhou Q-G, Zhu L-J, Chen C, Wu H-Y, Luo C-X, Chang L, Zhu D-Y. 2011. Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor. *J. Neurosci.* **31**, 7579–7590.

Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Carvalho LA, Pariante CM. 2010. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **35**, 722-729.

FIGURES

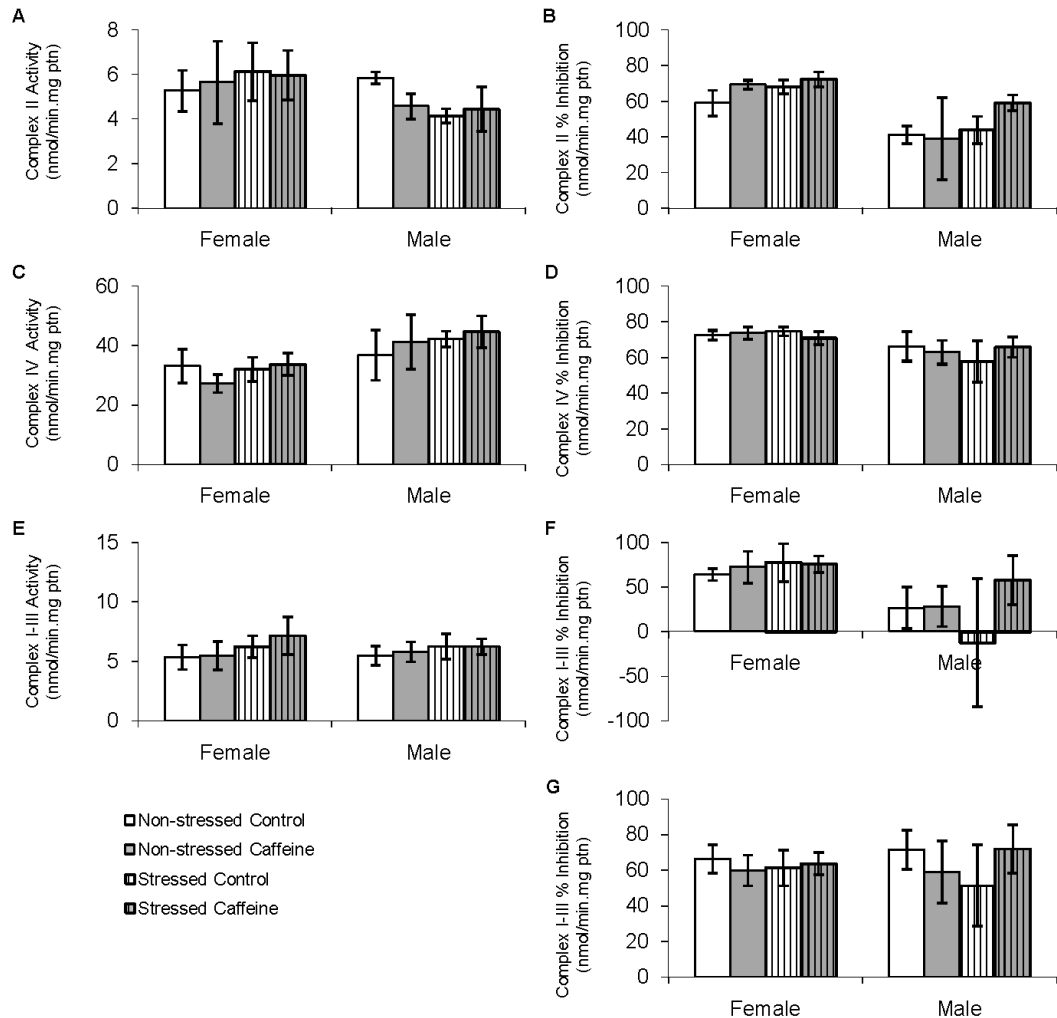


Figure 1: Effect of chronic restraint stress and chronic consumption of caffeine on mitochondrial enzymes activity and percentage of complexes inhibition in striatum of male and female rats. Values are expressed as mean \pm S.D, for 4-6 animals in each group. **A** complex II activity (expressed as nmol DCIP reduced/min. mg protein), **B** complex II percentage of inhibition, **C** complex IV activity (expressed as nmol cytochrome c oxidized/min. mg protein), **D** complex IV percentage of inhibition, **E** complex I-III activity (expressed as nmol cytochrome c reduced/min. mg protein), **F** complex I percentage of inhibition, **G** complex III percentage of inhibition. Three-way ANOVA showed a significant effect of sex in which females presented a higher activity than males in **A**, lower activity in **C** and higher inhibition in **B**, **D** and **F**. The stress increased the activity of complex in **C** and **E**. **Stress** and caffeine increased the inhibition of females in **B**. There was an interaction between stress and sex in **A** and between stress and caffeine in **C** and **G** ($P < 0.05$).

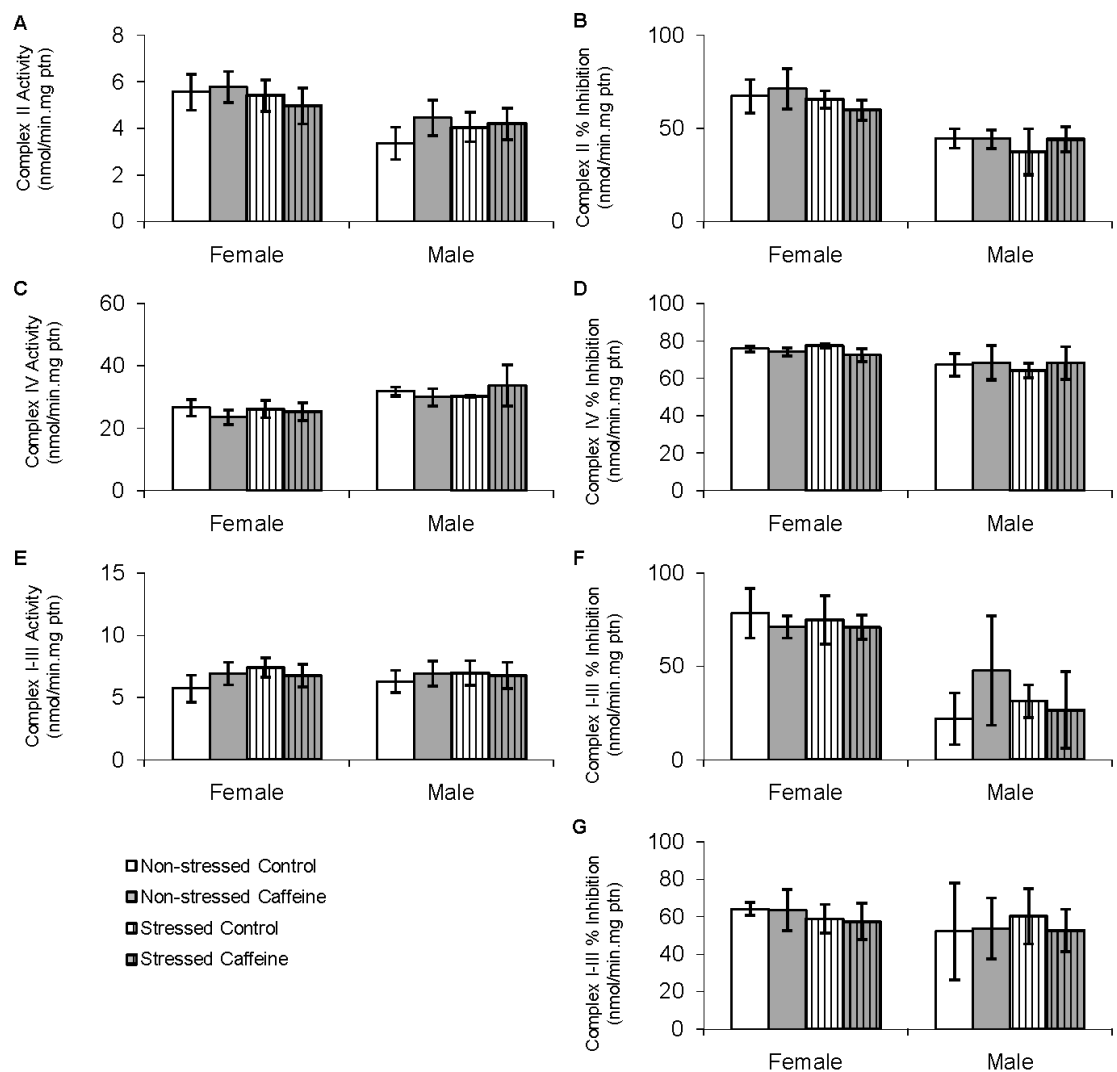


Figure 2: Effect of chronic restraint stress and chronic consumption of caffeine on mitochondrial enzymes activity and percentage of complexes inhibition in hippocampus of male and female rats. Values are expressed as mean \pm S.D, for 4-6 animals in each group. **A** complex II activity (expressed as nmol DCIP reduced/min. mg protein), **B** complex II percentage of inhibition, **C** complex IV activity (expressed as nmol cytochrome c oxidized/min. mg protein), **D** complex IV percentage of inhibition, **E** complex I-III activity (expressed as nmol cytochrome c reduced/min. mg protein), **F** complex I percentage of inhibition, **G** complex III percentage of inhibition. Three-way ANOVA showed a significant effect of sex in which females presented higher activity than males in **A**, lower activity in **C** and higher inhibition in **B**, **D** and **F** than male rats and there was an interaction between stress and caffeine in **E** ($P < 0.05$).

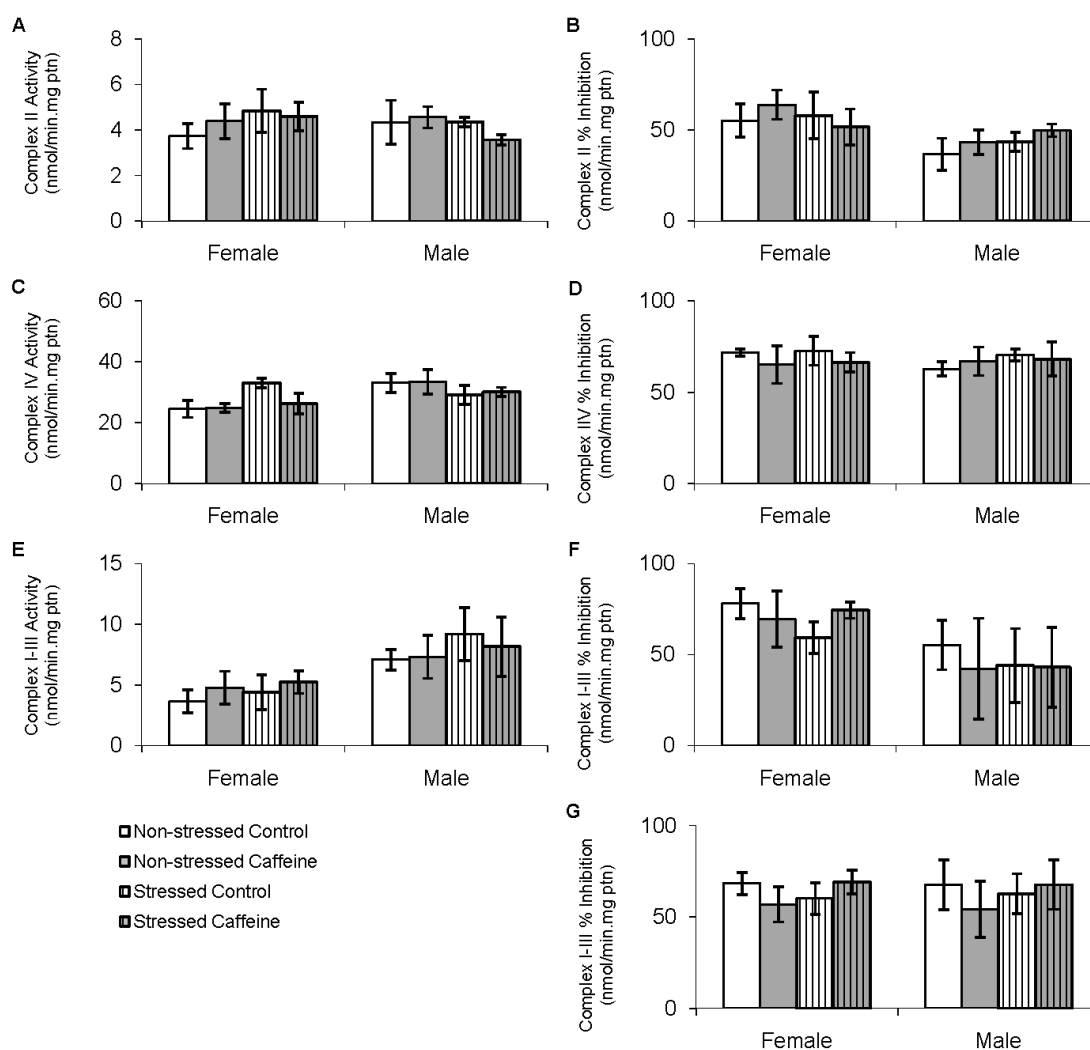


Figure 3: Effect of chronic restraint stress and chronic consumption of caffeine on mitochondrial enzymes activity and percentage of complexes inhibition in cortex of male and female rats. Values are expressed as mean \pm S.D, for 4-6 animals in each group. **A** complex II activity (expressed as nmol DCIP reduced/min. mg protein), **B** complex II percentage of inhibition, **C** complex IV activity (expressed as nmol cytochrome c oxidized/min. mg protein), **D** complex IV percentage of inhibition, **E** complex I-III activity (expressed as nmol cytochrome c reduced/min. mg protein), **F** complex I percentage of inhibition, **G** complex III percentage of inhibition. Three-way ANOVA showed a significant effect of sex in which females presented lower activity in **C** and **E** and higher inhibition in **B** and **F** than male rats. Stress increased the complex activity in **E** and there was an interaction between stress and caffeine in **A**, **F** and **G** and between stress and sex in **A** and **C** ($P < 0.05$).

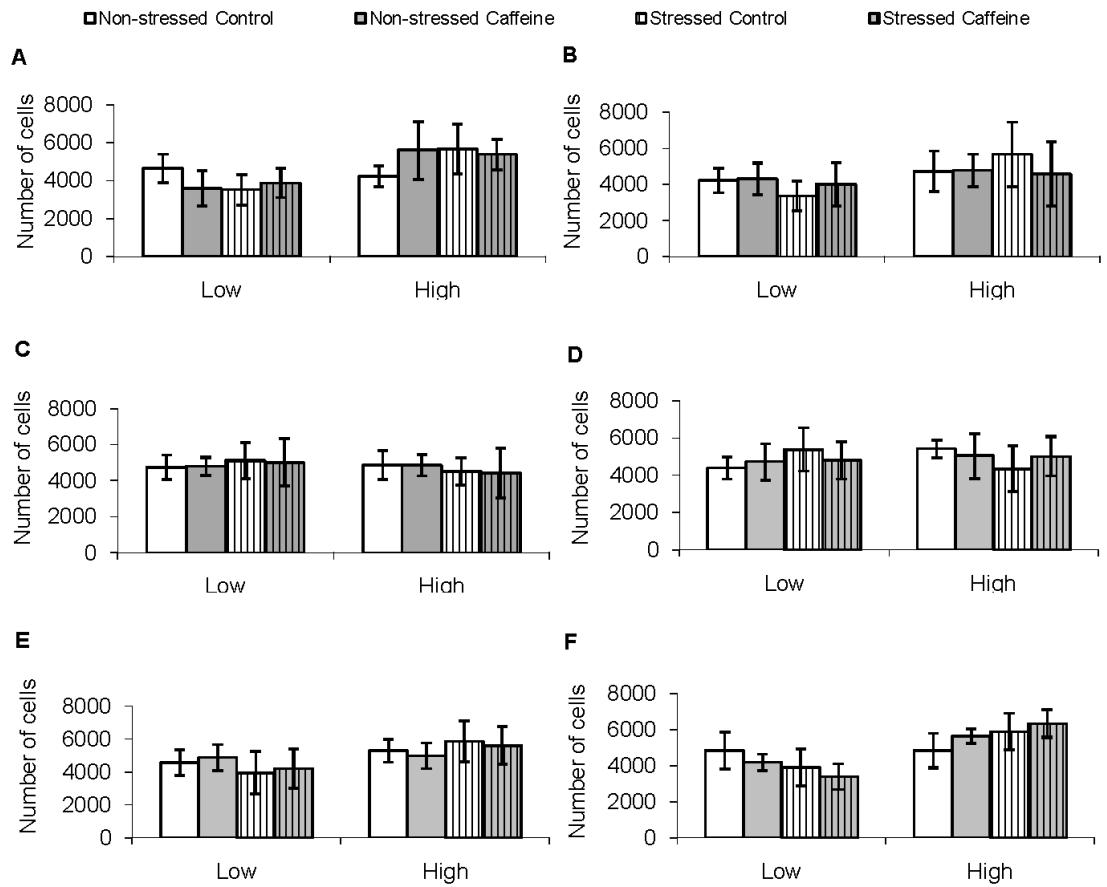


Figure 4: Mitochondrial mass of striatum (A), hippocampus (B) and cortex (C) of male rats and mitochondrial mass of striatum (D), hippocampus (E) and cortex (F) of female rats after chronic restraint stress and chronic consumption of caffeine. Values are expressed as mean \pm S.D. N = 4-5/group. Two-way ANOVA showed a significant effect of stress in female cortex (F) (low and high) and an interaction between stress and caffeine in male striatum (A) (low and high) ($P < 0.05$).

Capítulo 2 – Materiais e métodos e resultados adicionais.

Efeito do estresse crônico e da administração crônica de cafeína sobre o conteúdo de sinaptofisina e MAP2 em cérebro de ratos machos e fêmeas.

3.1.1. Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados 24 ratos Wistar adultos machos (60-120 dias no início do tratamento, pesando 150–230 g) e 24 ratas Wistar adultas fêmeas (60-120 dias no início do tratamento, pesando 140–200 g) provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram separados em grupos de 4 em caixas Plexiglas (65 x 25 x 15 cm) contendo maravalha e foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas entre 7:00 e 19:00), à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Os animais tiveram livre acesso à comida (ração padrão) e à água ou solução de cafeína, exceto para os animais estressados, que durante o período em que a contenção foi aplicada (1 h/dia) não tinham acesso ao alimento e à água. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle-água (receberam água para beber e não foram estressados), controle-cafeína (receberam cafeína na água de beber, na concentração de 1 g/L e não foram estressados), controle-estresse (foram estressados durante 40 dias, recebendo água para beber) e estresse-cafeína (foram estressados durante 40 dias, recebendo cafeína na água de beber na concentração de 1g/L).

O presente projeto foi submetido e aprovado no comitê de ética dessa universidade. Além disso, todos os procedimentos que constam nesse trabalho foram

realizados de forma padrão e sempre visando minimizar o desconforto dos animais envolvidos.

Estresse e Administração crônica de cafeína

Os animais foram estressados por contenção em cilindros plásticos conforme descrito no capítulo 1. Relembrando: os animais foram levados para uma sala diferente da sala moradia, onde foi realizado o procedimento de estresse por contenção: o animal foi colocado em um tubo plástico de 25x7cm, sendo este fixado com esparadrapo por fora de maneira que o animal ficasse incapaz de se mover. Na ponta do tubo havia um orifício de 1,5cm por onde o animal podia respirar. O procedimento de contenção foi realizado entre 11 e 14 horas. Os animais foram estressados durante uma hora por dia, cinco dias por semana em um total de 40 dias. Os animais controle foram mantidos em suas caixas moradia na sala moradia.

Preparação das amostras para imunohistoquímica

A avaliação foi realizada segundo o método previamente descrito por Hiscock et al (2000) para preparar as amostras para a imunohistoquímica. Vinte e quatro horas após a última sessão de estresse, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (30%, 10 ml/kg i.p.) e submetidos a perfusão transcardíaca com o auxílio de uma bomba peristáltica (fluxo de 20 ml/min) com 200ml de tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4. Após a remoção do cérebro da caixa craniana, os mesmos foram fixados com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo 4% de paraformaldeído (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) 1h à temperatura ambiente e permaneceram nesta solução à temperatura de 4°C *overnight*. Posteriormente foram criopreservados em uma solução

de sacarose a 15% e depois a 30% e fatiados coronariamente em um criostato (Leica) em fatias de 40 µm de espessura.

Imunohistoquímica

As fatias foram pré-incubadas com Triton X-100 (Sigma) 0,4% em PBS durante 10 minutos e, após, foram bloqueadas com uma solução de PBS contendo 0,4% de Triton X-100 e 5% de soro de cabra (Sigma-Aldrich) por 30 minutos à temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados neste estudo foram anticorpos monoclonais anti-sinaptofisina (Milissul) e MAP2 (Sigma) em solução de bloqueio e permeabilização (albumina e triton X-100 0,2%), e anticorpos secundários Alexa Flúor 488 e 568 da Molecular Probes. Visto que os anticorpos primários eram anti-camundongo, foi utilizado neste experimento o protocolo sequencial. Brevemente, as fatias foram primeiro incubadas com anticorpo primário anti-MAP2 (anticorpo de camundongo anti-rato, Sigma-Aldrich, diluição 1:500) a 4°C *overnight*. No dia seguinte as fatias foram incubadas com o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo Alexa 568 (Invitrogen, diluição 1:500) em uma câmara escura à temperatura ambiente durante uma hora e, após, foi realizada lavagem três vezes em PBS. Então, as fatias foram incubadas com o segundo anticorpo primário anti-sinaptofisina (anticorpo de camundongo anti-rato, Sigma-Aldrich, diluição 1:250) a 4°C *overnight*. No dia seguinte, as fatias foram incubadas com o segundo anticorpo secundário de cabra anti-camundongo Alexa 488 (Invitrogen, diluição 1:500) em uma câmara escura durante uma hora e, após, foi feita lavagem em PBS três vezes. Após a imunohistoquímica, as lâminas foram montadas com meio de montagem Fluoromont (Sigma-Aldrich) e lamínula. Para reduzir a variabilidade da coloração, os experimentos com as fatias de todos os grupos foram feitos na mesma corrida

imunohistoquímica. Os controles negativos foram feitos utilizando-se fatias incubadas sem os anticorpos primários.

Para visualizar os cortes histológicos foi utilizado o microscópio de fluorescência Olympus IX70 (utilizando-se os filtros para FITC e MCherry do microscópio e objetiva de 20). Cinco áreas randomizadas por região de interesse foram selecionadas por animal e as amostras foram analisadas por densitometria utilizando o programa Cell M da Olympus.

Análise estatística

Os dados dos experimentos foram expressos como média \pm S.D. e foram analisados por Análise de variância de duas vias.

3.1.2. Resultados

A ANOVA de duas vias demonstrou que não houve diferenças entre os grupos no conteúdo de MAP2 e sinaptofisina nas amostras das regiões CA1 e giro dentado analisadas (Figura 1).

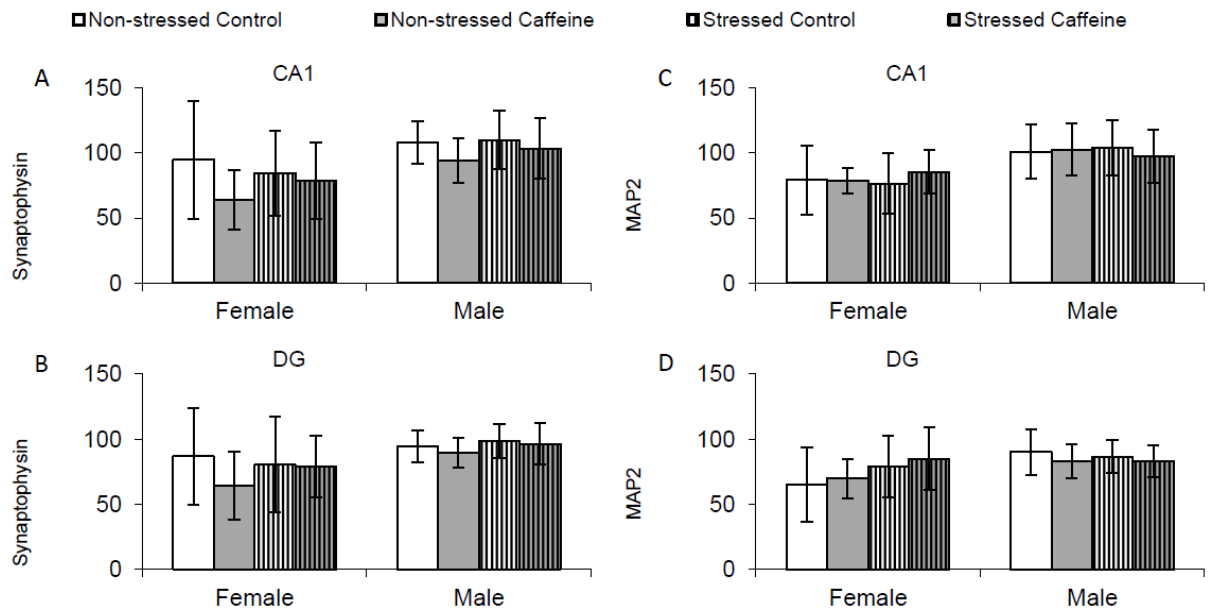


Figura 1: Efeito do estresse crônico e do consumo crônico de cafeína sobre o conteúdo de MAP2 e sinaptofisina em hipocampo de ratos machos e fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm S.D. de unidades arbitrárias de fluorescência, para 4-6 animais por grupo. **A** conteúdo de sinaptofisina na região CA1 de hipocampo, **B** conteúdo de sinaptofisina em giro dentado de hipocampo, **C** conteúdo de MAP2 na região CA1 de hipocampo, **D** conteúdo de MAP2 em giro dentado de hipocampo. Não foram observados efeitos significativos entre os grupos (ANOVA de duas vias).

4. DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstraram que o estresse crônico pode gerar efeitos fragilizantes no sistema nervoso (Nichols et al, 2001; Vasconcelos et al, 2003), caso não ocorra adaptação. Por outro lado, o consumo crônico de cafeína apresenta efeitos neuroprotetores em humanos e modelos animais de doenças neurodegenerativas (Fredholm et al, 1999; Cunha et al, 2006; Kalda et al, 2006). Além disso, a cafeína muitas vezes é consumida por pessoas estressadas na tentativa de combater a fadiga, o cansaço e aumentar a produção, porém poucos estudos investigam o efeito da interação do estresse e da cafeína. Trabalhos prévios de nosso grupo demonstraram que o estresse e a cafeína podem aumentar a ansiedade de ratos machos, sendo que quando os dois são combinados o aumento na ansiedade é maior do que o dos dois fatores isolados. O mecanismo pelo qual o estresse e a cafeína aumentam a ansiedade ainda não está claro, mas os glicocorticóides liberados pelo estresse e pela administração de cafeína (Swaab et al., 2005; Bao et al., 2008; Zavala et al, 2010; Zunszain et al., 2010) podem explicar, pelo menos em parte esse efeito. Devido ao exposto acima, e aos conhecidos efeitos dos glicocorticóides na mitocôndria (Demonacos et al, 1993; Scheller et al, 2000; Moutsatsou et al, 2001; Scheller et al, 2003) e no sistema nervoso central, este trabalho foi realizado a fim de investigar o papel da cafeína e do estresse em parâmetros mitocondriais e conteúdo de MAP2 e sinaptofisina em cérebro de ratos.

A análise da atividade da cadeia respiratória realizada neste trabalho mostrou que o estresse crônico, em linhas gerais, aumentou a atividade dos complexos em estriado de ratos machos e fêmeas. A única exceção foi o complexo II de estriado de machos, onde o estresse provocou uma redução na atividade deste complexo. Este resultado está de acordo com um estudo anterior deste grupo que demonstrou, entre outros parâmetros, que a atividade da superóxido dismutase aumentou em estriado de

ratos machos em resposta ao estresse crônico. Este aumento da atividade da superóxido dismutase foi atribuído a uma exacerbação da produção de espécies reativas de oxigênio, possivelmente provocado pelo estresse (Noschang et al, 2009). Sabe-se que a inibição do complexo II da cadeia transportadora de elétrons é capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (Indo et al., 2007; Liot et al., 2009), portanto, acreditamos que a inibição na atividade do complexo II apresentada no presente estudo esteja aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez, estão levando a um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase.

No presente estudo também foi observado um pronunciado aumento na atividade do complexo IV induzido pelo estresse em estriado de machos, o que está de acordo com um estudo em células de glioma de ratos que demonstrou que, quando estas células foram tratadas com glicocorticóides, os GRs translocaram da mitocôndria para o citosol, e deste para o núcleo. Esta translocação dos GRs induzida pela presença dos glicocorticóides levou a um aumento da expressão da citocromo oxidase-1 (Koufali et al, 2003).

Nas fêmeas, a atividade do complexo IV estriatal foi reduzida pela cafeína e houve uma interação entre cafeína e estresse, onde o estresse preveniu o efeito da cafeína. A cafeína também reduziu a atividade do complexo II em machos de maneira similar ao efeito do estresse observado neste complexo, e quando associados, a atividade permaneceu baixa. A cafeína tem seu mecanismo de neuroproteção associado com o bloqueio dos receptores de adenosina e, notavelmente, o estriado é a estrutura mais rica em receptores de adenosina no cérebro (Gomes et al, 2011). Um estudo conduzido por Jones e colaboradores demonstrou que a cafeína em dose única foi capaz de estimular a expressão da citocromo oxidase em machos, e não em fêmeas,

visto que o aumento da expressão observada nos machos era igual à expressão basal da enzima nas fêmeas (Jones et al, 2008). Além disso, o efeito encontrado no estudo de Jones também poderia ser atribuído ao aumento da liberação de glicocorticóides provocada pela cafeína (Swaab et al., 2005; Bao et al., 2008; Zunszain et al., 2010), já que os glicocorticóides, como mencionados anteriormente, são capazes de induzir a expressão dessa enzima. No presente estudo não verificamos um aumento na atividade do complexo IV condizente com o aumento na expressão dessa enzima provocada pela cafeína demonstrada por Jones. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que a cafeína foi administrada de maneira crônica no presente estudo, ao contrário do estudo de Jones, onde a droga foi administrada agudamente, além disso, muitas vezes um aumento de expressão de uma enzima não se reflete em aumento proporcional de sua atividade. De qualquer maneira, o mecanismo de neuroproteção do tratamento crônico com cafeína não parece estar relacionado ao seu efeito agudo de aumentar a expressão de citocromo oxidase.

Em hipocampo, a atividade do complexo II foi maior nas fêmeas do que em machos. Na atividade do complexo IV foi observado o oposto, com atividade maior no hipocampo de machos. Não foi observada diferença significativa entre os sexos em relação à atividade do complexo I-III. A atividade deste complexo foi levemente aumentada pela cafeína e pelo estresse, e a interação entre estes fatores reduziu a atividade do complexo ao nível do controle. Em um estudo anterior de nosso grupo também não foram observados efeitos significativos do estresse crônico ou da cafeína sobre as enzimas antioxidantes em hipocampo de ratos machos (Noschang et al, 2009). A manutenção dos circuitos neurais relacionados ao estresse é regulada principalmente pelos MRs no hipocampo, já que é a estrutura cerebral onde se concentra a maior parte destes receptores em roedores. Já os GRs são importantes para normalizar a

homeostase e armazenar a informação, preparando-a para uso futuro (Zhou et al, 2011). O aumento da expressão de MRs no cérebro altera a expressão de genes associados com o estresse e a ansiedade, levando a uma redução dos GRs hipocampais (Rozeboom et al, 2007). A presença hipocampal seletiva dos MRs pode ter levado à adaptação seletiva desta estrutura aos efeitos do estresse crônico repetido observado no presente trabalho e no trabalho realizado por Noschang e colaboradores (Noschang et al, 2009).

Em córtex cerebral, as fêmeas apresentaram menor atividade dos complexos I-III e IV do que os machos, mas tiveram um aumento na atividade de todos os complexos analisados induzido pelo estresse. Os machos, por sua vez, tiveram aumento da atividade do complexo II, mas este aumento foi menos pronunciado do que o observado nas fêmeas. A cafeína também aumentou a atividade do complexo II nas fêmeas, mas quando associada ao estresse a atividade foi semelhante à observada nos controles. Já o complexo IV sofreu uma redução induzida pelo estresse em machos, oposto ao observado nas fêmeas. Neste complexo, as fêmeas apresentaram uma interação entre estresse e cafeína, levando a atividade de volta aos níveis do controle. Em estudo anterior de nosso grupo, não foram observados efeitos da cafeína sobre as enzimas antioxidantes de córtex de animais machos estressados cronicamente (Noschang et al, 2009).

Os glicocorticóides podem regular a função mitocondrial de maneira dose-dependente em uma curva em forma de “U invertido”. Isto é, em baixas doses, os glicocorticóides aumentam a expressão de proteínas mitocondriais, porém em doses mais elevadas, os receptores de glicocorticóides translocam para a mitocôndria e iniciam a cascata de autofagia e/ou apoptose (Filipović et al, 2011). Dessa maneira, em pequenas doses, os glicocorticóides podem exercer efeitos neuroprotetores, enquanto

que em altas doses podem aumentar a susceptibilidade dos neurônios corticais a danos (Du et al, 2008). Esta curva dose-dependente em forma de “U invertido” provavelmente se relaciona com a ligação dos glicocorticóides aos GRs e sua translocação a diferentes compartimentos celulares. Essa curva em “U invertido” também pode explicar as diferenças encontradas entre o presente estudo e os estudos já existentes (Jones et al, 2008), principalmente no que se refere ao tamanho do aumento na atividade da citocromo oxidase. Nos estudos agudos, observou-se um grande aumento na quantidade dessa enzima, quantificada por Western Blot, logo se esperava um grande aumento de sua atividade no presente estudo, o que não aconteceu. Essa diferença pode ter ocorrido por dois motivos: 1) apesar de ter mais enzima sua atividade específica é menor, ou 2) ocorreu uma adaptação no sistema durante o estresse crônico que levou a uma menor ligação do glicocorticóide ao seu receptor.

Após as dosagens das atividades das enzimas da cadeia respiratória nas condições ótimas, decidimos investigar se as enzimas dos animais estressados cronicamente e/ ou tratados cronicamente com cafeína manteriam essa atividade maior frente a um inibidor. Artigos prévios demonstraram que o estradiol não prejudica a atividade da cadeia respiratória (Irwin et al, 2008; Simpkins, 2010) , porém protegia as células de tecido nervoso de um insulto causado por inibidores da cadeia respiratória (Yao et al, 2011). Vários mecanismos podem explicar essa proteção, dentre elas podemos citar alterações do metabolismo do cálcio, alterações de vias de apoptose e autofagia e alterações da própria sensibilidade da enzima aos inibidores (Simpkins et al, 2010). Devido a isso decidimos testar a sensibilidade das enzimas dos animais tratados frente aos inibidores.

Quando avaliada a atividade da cadeia respiratória na presença dos inibidores clássicos de cada complexo, foi observado que no estriado, em geral, ocorreu uma inibição maior nas fêmeas do que nos machos. No estriado o estresse e a cafeína aumentaram a inibição no complexo II de maneira mais pronunciada nas fêmeas. Houve uma interação entre o estresse e a cafeína na inibição do complexo III, sendo que esta foi mais pronunciada nos machos.

No hipocampo de fêmeas, de modo similar ao estriado, a inibição foi maior que a observada no hipocampo dos machos, não apresentando diferenças entre os sexos apenas na presença de antimicina (inibição do complexo III).

Em córtex de fêmeas ocorreu uma maior inibição apenas no complexo I e II, sem diferenças entre os sexos na inibição dos complexos III e IV. O estresse ou a cafeína reduziram a inibição do complexo I em fêmeas ou do complexo III em ambos os sexos, e juntos interagiram aumentando a inibição aos níveis dos controles de maneira semelhante à observada na inibição do complexo III no estriado de machos.

Juntos, estes dados sugerem que o estresse e a cafeína apresentam respostas variáveis, aumentando ou diminuindo a inibição dependendo da estrutura cerebral e do complexo analisados, e que as enzimas do cérebro das fêmeas parecem ser mais sensíveis à inibição provocada por inibidores clássicos dos complexos da cadeia transportadora de elétrons. Sabe-se que os estrogênios são potentes agentes neuroprotetores, exercendo ação protetora, por exemplo, em células expostas ao 3-NPA (Wang, 2001). Porém neste estudo de Wang (2001) as células foram expostas a uma quantidade extra de estradiol. No presente estudo nenhum estradiol exógeno foi adicionado, além disso, o estradiol presente no cérebro das fêmeas foi diluído 20 vezes, já que o tecido foi homogeneizado em tampão em uma proporção de 1:20. Essa

diminuição repentina na concentração de estradiol no meio poderia explicar, pelo menos em parte, a maior sensibilidade do tecido das fêmeas aos inibidores.

Na análise da massa mitocondrial, foi observado que esta somente apresentou aumento significativo no córtex de fêmeas submetidas ao estresse crônico e no estriado de machos estressados cronicamente e tratados cronicamente com cafeína. Esta análise de massa mitocondrial foi realizada para verificar se os aumentos observados nas atividades dos complexos da cadeia respiratória eram devidos ao aumento na massa mitocondrial, isto é, na quantidade de mitocôndria. Um aumento na massa mitocondrial pode ser interpretado como aumento na biogênese de mitocôndrias ou *swelling* mitocondrial. A biogênese mitocondrial pode ocorrer devido ao estresse ou a cafeína afetarem a expressão de genes de proteínas mitocondriais (Koufali et al, 2003; Jones et al, 2008). Por outro lado, o estresse, como muitos compostos indutores de apoptose, pode prejudicar o potencial de membrana levando à abertura do poro de permeabilidade mitocondrial levando assim ao *swelling* mitocondrial. O aumento na superfície de contato da mitocôndria pode explicar o aumento da massa mitocondrial detectada neste estudo. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar como o estresse e a cafeína aumentam a massa mitocondrial em estruturas cerebrais de ratos machos e fêmeas e se o aumento de massa foi devido à biogênese de mitocôndrias ou a *swelling* mitocondrial.

Devido ao fato de não podermos afirmar se esse aumento de atividade da cadeia respiratória foi um mecanismo compensatório após um insulto provocado pelos tratamentos crônicos utilizados nesse estudo, aumento esse que não ocorreu no hipocampo, estrutura que mais sofre os efeitos deletérios do estresse, segundo a literatura, decidimos investigar os efeitos do estresse crônico e do tratamento crônico

com cafeína sobre o conteúdo de sinaptofisina e de MAP2 no hipocampo dos animais tratados.

Sinaptofisina é uma proteína sináptica envolvida na regulação da exocitose vesicular dependente de cálcio e liberação de neurotransmissores (Greengard et al, 1993; Sudhof et al, 1987). Existem estudos demonstrando efeitos deletérios do estresse nos espinhos dendríticos, na conectividade sináptica e conteúdo de sinaptofisina e espinofilina de hipocampo (Khurana e Devaud, 2007; Ryan et al, 2005). O estudo de Thome e colaboradores (2001), por exemplo, demonstrou os efeitos deletérios do estresse agudo (contenção por uma hora) ou crônico (contenção por uma hora por dia, durante cinco dias) sobre a expressão da sinaptofisina. Após a exposição ao estresse, a expressão de sinaptofisina foi reduzida em diferentes regiões hipocâmpais de ratos, como a região CA1, CA3 e giro dentado, o que pode estar associado aos danos hipocâmpais que ocorrem durante o estresse. Além disso, segundo o estudo de Pham e colaboradores (2003), o estresse crônico repetido parece levar a uma redução da neurogênese das células granulares do giro dentado.

A MAP2 (MAP, do inglês: *microtubule-associated protein*) é uma proteína envolvida na regulação das redes de microtúbulos nos axônios e dendritos neuronais (Dehmelt e Halpain, 2005), cujo padrão de distribuição em córtex e hipocampo é alterado após estresse crônico por contenção em ratos (Yan et al, 2010). Também há evidências do efeito de glicocorticóides sobre a MAP2 de estriado e hipocampo de ratos. Os glicocorticóides causam danos neuronais ao induzirem redução do conteúdo da MAP2 nestas estruturas, sendo o giro dentado, e as regiões CA1 e CA3 especialmente vulneráveis (Haynes et al, 2001).

No presente estudo avaliamos através de imunohistoquímica o conteúdo de sinaptofisina e MAP2 na região CA1 e giro dentado de hipocampo de ratos, a fim de

verificar se o estresse crônico afetaria a quantidade destas importantes proteínas. Também avaliamos o efeito da cafeína neste contexto.

As análises estatísticas demonstraram que nem o estresse crônico, nem o tratamento crônico com cafeína foram capazes de gerar alterações significativas nesses parâmetros no hipocampo dos animais. Porém, houve uma tendência à redução no conteúdo de sinaptofisina induzida pela cafeína. A dose de cafeína utilizada neste estudo (1g/L) pode ser considerada moderada e, apesar de ser utilizada em muitos estudos, é acima da dose média consumida por bebedores de café. Porém essa dose pode ser atingida por pessoas que bebem muito café, energéticos, refrigerante a base de cola ou consomem cápsulas de cafeína, Acreditamos que uma dose maior do que a utilizada no presente estudo ou um tratamento mais prolongado poderia ser capaz de diminuir o conteúdo de sinaptofisina, evidenciando uma toxicidade de altas doses de cafeína.

Joels (2006) demonstrou que ambos receptores MR e GR hipocampais medeiam a resposta bifásica aos hormônios adrenais na região CA1 e não em giro dentado. Com isso, era esperado observar neste estudo alterações induzidas pelo estresse pelo menos na região CA1, o que não ocorreu. É possível que o animal tenha se habituado ao estresse prolongado, como já relatado na literatura (Kitraki et al, 1999), e as alterações no conteúdo de MAP2 e sinaptofisina observadas em outros estudos envolvendo estresse crônico (Gao et al, 2006) tenham se dado devido ao menor tempo de exposição dos animais ao procedimento do estresse.

5. CONCLUSÕES

- O estresse crônico levou a alterações sexo-específicas e estrutura-específicas na atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons e na massa mitocondrial;
- O hipocampo, uma estrutura especialmente vulnerável aos efeitos dos glicocorticóides mostrou efeitos menores que o esperado, provavelmente por ter sofrido adaptação;
- A cafeína administrada de maneira crônica apresentou poucos efeitos sobre a massa mitocondrial e atividade dos complexos da cadeia respiratória, portanto o efeito neuroprotetor da cafeína não é devido a um aumento na atividade dessas enzimas, não confirmando o mecanismo de neuroproteção alternativo (aumento de expressão de proteínas da cadeia respiratória) proposto em estudos agudos com essa droga;
- Tanto a cafeína quanto o estresse não alteraram significativamente o conteúdo das proteínas presentes nos espinhos dendríticos, sinaptofisina ou MAP2.
- São necessários mais estudos avaliando outros parâmetros, como dinâmica de cálcio mitocondrial, e vias de apoptose e autofagia frente a um insulto, por exemplo, para verificar o envolvimento da cafeína com a atividade mitocondrial.

6. PERSPECTIVAS

Para obter uma melhor compreensão dos resultados obtidos neste estudo seria importante analisar os efeitos de diferentes doses de um glicocorticóide (p. ex. dexametasona) e da cafeína em cultura primária de neurônios de maneira aguda e crônica. Neste contexto seriam avaliados:

- Atividade da cadeia respiratória nas células tratadas com diferentes doses de cafeína e dexametasona;
- Massa mitocondrial das células tratadas;
- Expressão dos complexos da cadeia respiratória;
- Viabilidade celular das células tratadas frente a um insulto celular induzido pelos inibidores clássicos da cadeia respiratória;
- Translocação dos GRs nas células tratadas em diferentes tempos;
- Efeitos do estradiol sobre estes parâmetros citados acima.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acquas E., Tanda G., Di Chiara G. Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, p. 182-193, 2002.
- Aguiar L.M., Nobre Jr H.V., Macedo D.S., Oliveira A.A., Freitas R.M., Vasconcelos S.M., Cunha G.M., Sousa F.C., Viana G.S. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 84, p. 415-419, 2006.
- Ascherio A., Zhang S.M., Hernan M.A., Kawachi I., Colditz G.A., Speizer F.E., Willett W.C. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Ann Neurol**, v. 50, p. 56-63, 2001.
- Ascherio A., Weisskopf M.G., O'Reilly E.J., McCullough M.L., Calle E.E., Rodriguez C., Thun M.J. Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. **Am J Epidemiol**, v. 160, p. 977-984, 2004.
- Babcock G.T. How oxygen is activated and reduced in respiration. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 12971-12973, 1999.
- Bao A.M., Meynen G., Swaab D.F. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. **Brain Res Rev**, v. 57, p. 531-553, 2008.
- Beaumont K. and Fanestil D.D. Characterization of rat brain aldosterone receptors reveals high affinity for corticosterone. **Endocrinology**, v.113, p. 2043-2049, 1988.
- Borrás C., Gambini J., Gómez-Cabrera M.C., Sastre J., Pallardó F.V., Mann G.E., Viña J. 17 β -estradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme

- expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. **Aging Cell**, v. 4, p. 113-118, 2005.
- Bowman R., MacLusky N.J., Sarmiento Y., Frankfurt M., Gordon M., Luine V.N. Sexually Dimorphic Effects of Prenatal Stress on Cognition, Hormonal Responses, and Central Neurotransmitters. **Endocrinology**, v. 145, p. 3778–3787, 2004.
- Brandt U. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). **Annu Rev Biochem**, v. 75, p. 69-92, 2006.
- Brinton R.D. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. **Trends Neurosci**, v. 31, p. 529-537. 2008.
- Hägerhäll C. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. **Biochim biophys acta**, v. 1320, p. 107-141, 1997.
- Cognato G.P., Agostinho P.M., Hockemeyer J., Müller C.E., Souza D.O., Cunha R.A. Caffeine and an adenosine A(2A) receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. **J Neurochem**, v.112, p. 453-462, 2010.
- Calkins M.J., Manczak M., Mao P., Shirendeb U., Reddy P.H. Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. **Hum Mol Genet**, v. 20, p. 4515-4529, 2011.
- Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L., Lesnefsky E.J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. **J Biol Chem**, v. 278, p. 36027–36031, 2003.

- Costa J., Lunet N., Santos C., Santos J., Vaz-Carneiro A. Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **J Alzheimers Dis**, v. 20, p. S221-S238, 2010.
- Cunha R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 111–134, 2005.
- Cunha G.M., Canas P.M., Oliveira C.R., Cunha R.A. Increased density and synapto-protective effect of adenosine A2A receptors upon sub-chronic restraint stress. **Neuroscience**, v. 141, p. 1775-1781, 2006.
- Dall'Igna O.P., Hoffmann A., da Silva A.L., Souza D.O., Lara D.R. Beta-amyloid treatment sensitizes mice to amphetamine-induced locomotion but reduces response to caffeine. **Neurodegener Dis**, v. 1, p. 38-43, 2004.
- Dall'Igna O.P., Fett P., Gomes M.W., Souza D.O., Cunha R.A., Lara D.R. Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Exp Neurol**, v. 203, p. 241-245, 2007.
- Darrouzet E., Issartel J.P., Lunardi J., Dupis A. The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone related inhibitors. **FEBS Lett**, v. 431, p. 34–38, 1998.
- Degli Esposti M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. **Biochim Biophys Acta**, v. 1364, p. 222-235, 1998.
- Dehmelt L. and Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. **Genome Biol**, v. 6, p. 204, 2005.
- Demonacos C., Tsawdaroglou N.C., Djordjevic-Markovic R., Papalopoulou M., Galanopoulos V., Papadogeorgaki S., Sekeris C.E. Import of the glucocorticoid

receptor into rat liver mitochondria in vivo and in vitro. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 46, p. 401–413, 1993.

Devi L., Raghavendran V., Prabhu B.M., Avadhani N.G., Anandatheerthavarada H.K. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. **J Biol Chem**, v. 283, p. 9089–9100, 2008.

Donohue H.S., Gabbott P.L., Davies H.A., Rodrigues J.J., Cordero M.I., Sândi C., Medvedev N.I., Popov V.I., Colyer F.M., Peddie C.J., Stewart M.G. Chronic restraint stress induces changes in synapse morphology in stratum lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: a stereological and three-dimensional ultrastructural study. **Neuroscience**, v. 140, p. 597–606, 2006.

Du H., Guo L., Fang F., Chen D., Sosunov A.A., McKhann G.M., Yan Y., Wang C., Zhang H., Molkentin J.D., Gunn-Moore F.J., Vonsattel J.P., Arancio O., Chen J.X., Yan S.D. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. **Nat Med**, v. 14, p. 1097-1105, 2008.

Du H., Guo L., Yan S.S. Synaptic mitochondrial pathology in Alzheimer's disease.
DOI: 10.1089/ars.2011.4277

Eteng M.U., Eyong E.U., Akpanyung E.O., Agiang M.A., Aremu C.Y. Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. **Plant Foods for Hum Nutr**, v. 51, p. 231-243, 1997.

Filipović D., Zlatković J., Inta D., Bjelobaba I., Stojiljkovic M., Gass P. Chronic isolation stress predisposes the frontal cortex but not the hippocampus to the

potentially detrimental release of cytochrome c from mitochondria and the activation of caspase-3. **J Neurosci Res**, v. 89, p. 1461-1470, 2011.

Fitzsimons C.P., Ahmed S., Wittevrongel C.F., Schouten T.G., Dijkmans T.F., Scheenen W.J., Schaaf M.J., de Kloet E.R., Vreugdenhil E. The Microtubule-Associated Protein Doublecortin-Like Regulates the Transport of the Glucocorticoid Receptor in Neuronal Progenitor Cells. **Mol Endocrinol**, v. 22, p. 248-262, 2008.

Föcking M., Schmiegelt D., Trapp T. Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 337, p. 435-439, 2005.

Foster K.A., Galeffi F., Gerich F.J., Turner D.A., Müller M. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. **Prog Neurobiol**, v. 79, p. 136-171, 2006.

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

Galea L.A., McEwen B.S., Tanapat P., Deak T., Spencer R.L., Dhabha F.S. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. **Neuroscience**, v. 81, p. 689-697, 1997.

Gao Y., Bezchlibnyk Y.B., Sun X., Wang J.F., McEwen B.S., Young L.T. Effects of restraint stress on the expression of proteins involved in synaptic vesicle exocytosis in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 141, p. 1139-1148, 2006.

- Gomes C.V., Kaster M.P., Tomé A.R., Agostinho P.M., Cunha R.A. Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. **BBA – Biomembranes**, v. 1808, p. 1380-1399, 2011.
- Greengard P., Valtorta F., Czernik A.J., Benfenati F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. **Science**, v. 259, p. 780-785, 1993.
- Greenstein S., Ghias K., Krett N.L., and Rosen S.T. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. **Clin Cancer Res**, v.8, p.1681–1694, 2002.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M. Free radicals in biology and medicine. 4^a ed. New York, **Oxford University Press**, 2007.
- Hancock D.B., Martin E.R., Stajich J.M., Jewett R., Stacy M.A., Scott B.L., Vance J.M., Scott W.K. Smoking, caffeine, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in families with Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 4, p. 576-580, 2007.
- Haynes L.E, Griffiths M.R, Hyde R.E, Barber D.J, Mitchell I.J. Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders. **Neuroscience**, v. 104, p. 57–69, 2001.
- Hiscock J.J., Murphy S., Willoughby J.O. Confocal microscopic estimation of GABAergic nerve terminals in the central nervous system. **J Neurosci Methods**, v. 95, p. 1-11, 2000.
- Indo H.P., Davidson M., Yen H.C., Suenaga S., Tomita K., Nishii T., Higuchi M., Koga Y., Ozawa T., Majima H.J. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. **Mitochondrion**, v. 7, p. 106–118, 2007.

- Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. **Endocrinology**, v. 149, p. 3167-3175, 2008.
- Jones F.S., Jing J., Stonehouse A.H., Stevens A., Edelman G.M. Caffeine stimulates cytochrome oxidase expression and activity in the striatum in a sexually dimorphic manner. **Mol Pharmacol**, v. 74, p. 673-684, 2008.
- Joels M. Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, p. 244-250, 2006.
- Kalda A., Yu L., Oztas E., Chen J.F. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v. 248, p. 9-15, 2006.
- Kawata M. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. **Neurosci Res**, v. 24, p. 1-46, 1995.
- Khurana R.C., Devaud L.L. Sex differences in neurotransmission parameters in response to repeated mild restraint stress exposures in intact male, female and ovariectomised female rats. **J Neuroendocrinol**, v. 19, p. 511-520, 2007.
- Kitraki E., Karandrea D., Kittas C. Long-lasting effects of stress on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain. **Neuroendocrinology**, v. 69, p. 331-338, 1999.
- Krozowski Z.S., Funder J.W. Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone binding species have identical intrinsic steroid specificity. **Proc Natl Acad Sci**, v.80, p. 6056-6060, 1983.

- Koufali M.M., Moutsatsou P., Sekeris C.E., Breen K.C. The dynamic localization of the glucocorticoid receptor in rat C6 glioma cell mitochondria. **Mol Cell Endocrinol**, v. 209, p. 51-60, 2003.
- Liot G., Bossy B., Lubitz S., Kushnareva Y., Sejbuk N., Bossy-Wetzel E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. **Cell Death Differ**, v. 16, p. 899–909, 2009.
- Lloret A., Badía M.C., Mora N.J., Ortega A., Pallardó F.V., Alonso M.D., Atamna H., Viña J. Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 44, p. 2019-2025, 2008.
- Lorenzo A.M., León D., Castillo C.A., Ruiz M.A., Albasanz J.L., Martín M. Maternal caffeine intake during gestation and lactation down-regulates adenosine A1 receptor in rat brain from mothers and neonates. **J Neurosci Res**, v. 88, p. 1252-1261, 2010.
- Luine V.N., Beck K.D., Bowman R.E., Frankfurt M., Maclusky N.J. Chronic stress and neural function: accounting for sex and age. **J Neuroendocrinol**, v. 19, p. 743-751, 2007.
- Magarinos A.M., Verdugo J.M., McEwen B.S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. **Proc Natl Acad Sci**, v. 94, p. 14002–14008, 1997.
- Maia L. and de Mendonca A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? **Eur J Neurol**, v. 9, p. 377-382, 2002.
- Manczak M., Anekonda T.S., Henson E., Park B.S., Quinn J., Reddy P.H. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease

neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. **Hum Mol Genet**, v. 15, p. 1437–1449, 2006.

McConnell G.K., Ng G.P., Phillips M., Ruan Z., Macaulay S.L., Wadley G.D. Central role of nitric oxide synthase in AICAR and caffeine-induced mitochondrial biogenesis in L6 myocytes. **J Appl Physiol**, v. 108, p. 589-595, 2010.

McLaughlin, KF, Baran, SE, Wright, RL, Conrad, CD. Chronic stress enhances spatial memory in ovariectomized female rats despite CA3 dendritic retraction: possible involvement of CA1 neurons. **Neuroscience**, v. 135, p. 1045–1054, 2005.

Menezes-Ferreira M. M. and Torresani, J. Mechanism of action of thyroid hormones at the cellular level. **Ann Endocrinol**, v. 44, p. 205–216, 1983.

Moreira P.I., Zhu X., Wang X., Lee H.G., Nunomura A., Petersen R.B., Perry G., Smith M.A. Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1802, p. 212-220, 2010.

Moutsatsou P., Psarra A.M., Tsiapara A., Paraskevakou H., Davaris P., Sekeris C.E. Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, v. 386, p. 69–78, 2001.

Nichols R.M., Zieba M., Bye N. Do glucocorticoids contribute to brain aging? **Brain Res Rev**, v. 37, p. 273–286, 2001.

Noschang C.G., Pettenuzzo L.F., von Pozzer Toigo E., Andrezza A.C., Krolow R., Fachin A., Avila M.C., Arcego D., Crema L.M., Diehl L.A., Gonçalves C.A., Vendite D., Dalmaz C. Sex-specific differences on caffeine consumption and chronic stress-induced anxiety-like behavior and DNA breaks in the hippocampus. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 94, p. 63-69, 2009.

- Pettenuzzo L.F., Noschang C., von Pozzer Toigo E., Fachin A., Vendite D., Dalmaz C. Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. **Physiol Behav**, v. 95, p. 295-301, 2008.
- Pham K., Nacher J., Hof P.R., McEwen B.S. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. **Eur J Neurosci**, v. 17, p. 1–8, 2003.
- Pratt W.B., Galigniana M.D., Harrell J.M., DeFranco D.B. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. **Cell Signal**, v. 16, p. 857–872, 2004.
- Prediger R.D., Batista L.C., Takahashi R.N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol Aging**, v. 26, p. 957-964, 2005.
- Quarta D., Ferré S., Solinas M., You Z.B., Hockemeyer J., Popoli P., Goldberg S.R. Opposite modulatory roles for adenosine A1 and A2A receptors on glutamate and dopamine release in the shell of the nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. **J Neurochem**, v. 88, p. 1151-1158, 2004.
- Radley J.J., Rjocher A.B., Miller M., Janssen W.G., Listen C., Hof P.R., McEwen B.S., Morrison J.H. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. **Cereb Cortex**, v. 16, p. 313–320, 2006.
- Reddy P.H. and Beal M.F. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. **Trends Mol Med**, v. 14, p. 45–53, 2008.
- Reddy P.H., Manczak M., Mao P., Calkins M.J., Reddy A.P., Shirendeb U. Amyloid-beta and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for

synaptic damage and cognitive decline. **J Alzheimers Dis**, v. 20, p. S499–S512, 2010.

Rozeboom A.M., Akil H., Seasholtz A.F. Mineralocorticoid receptor overexpression in forebrain decreases anxiety-like behavior and alters the stress response in mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, p. 4688–4693, 2001.

Rupprecht R., Reul J.M.H.M., van Steensel B., Spengler D., Soder M., Berning B., Holsboer F., Damm K. Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. **Eur J Pharmacol**, v. 247, p. 145–154 1993.

Ryan X.P., Alldritt J., Svenningsson P., Allen P.B., Wu G.Y., Nairn A.C., Greengard P. The Rho-specific GEF Lfc interacts with neurabin and spinophilin to regulate dendritic spine morphology. **Neuron**, v. 47, p. 85-100, 2005.

Schaaf M.J. and Cidlowski J.A. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 83, p. 37–48, 2002.

Schapira A.H., Cooper J.M., Dexter D., Clark J.B., Jenner P., Marsden C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 54, p. 823–827, 1990.

Scheller K., Sekeris C.E., Krohne G., Hock R., Hansen I.A., Scheer U. Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells. **Eur J Cell Biol**, v. 79, p. 299–307, 2000.

Scheller K., Seibel P., Sekeris C.E. Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. **Int Rev Cytol**, v. 222, p. 1–61, 2003.

- Simon K.C., Chen H., Gao X., Schwarzschild M.A., Ascherio A. Reproductive factors, exogenous estrogen use, and risk of Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 24, p. 1359-1365, 2009.
- Simpkins J.W., Yi K.D., Yang S.H., Dykens J.A. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1800, p. 1113-1120, 2010.
- Sionov R.V., Cohen O., Kfir S., Zilberman Y., Yefenof E. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. **J Exp Med**, v. 203, p. 189-201, 2006.
- Sudhof T.C., Lottspeich F., Greengard P., Mehl E., Jahn R. A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. **Science**, v. 238, p. 1142-1144, 1987.
- Swaab D.F., Bao A.M., Lucassen P.J. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing Res Rev**, v. 4, p. 141–194, 2005.
- Thome J., Pesold B., Baader M., Hu M., Gewirtz J.C., Duman R.S., Henn F.A. Stress differentially regulates synaptophysin and synaptotagmin expression in hippocampus. **Biol Psychiatry**, v. 50, p. 809-812, 2001.
- Uht R.M., Anderson C.M., Webb P., Kushner P.J. Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element. **Endocrinology**, v. 138, p. 2900-2908, 1997.
- Vasconcellos A.P., Tabajara A.S., Ferrari C., Rocha E., Dalmaz C. Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. **Phys & Behav**, v. 79, p. 143– 149, 2003.
- Yan J., Sun X.B., Wang H.Q., Zhao H., Zhao X.Y., Xu Y.X., Guo J.C., Zhu C.Q. Chronic restraint stress alters the expression and distribution of phosphorylated

- tau and MAP2 in cortex and hippocampus of rat brain. **Brain Res**, v. 1347, p. 132-141, 2010.
- Yao J, Chen S, Cadenas E, Brinton RD. Estrogen protection against mitochondrial toxin-induced cell death in hippocampal neurons: antagonism by progesterone. **Brain Res**, v. 1379, p. 2-10, 2011.
- Wang X., Su B., Siedlak S.L., Moreira P.I., Fujioka H., Wang Y., Casadesus G., Zhu X. Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 19318–19323, 2008.
- Watanabe, Y, Gould, E, McEwen, BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Res**, v. 588, p. 341–345, 1992.
- Wang J., Green P.S., Simpkins J.W. Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. **J Neurochem**, v. 77, p. 804-811, 2001.
- Zavala J. K. , Fernandez A. A. , Gosselink K.L. Female responses to acute and repeated restraint stress differ from those in males. **Physiol & Behav**, v.104, p. 215-221, 2010.
- Zhou Q.G., Zhu L.J., Chen C., Wu H.Y., Luo C.X., Chang L., Zhu D.Y. Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor. **J Neurosci**, v. 31, p. 7579–7590, 2011.

Zunszain P.A., Anacker C., Cattaneo A., Carvalho L.A., Pariante C.M.
Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. **Biol Psychiatry**, v. 35, p. 722-729, 2010.