

RENATA VIANA ABREU

EFEITO PROMNÉSICO E ANTIOXIDANTE  
DO CAFÉ NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL  
DE RATOS

Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte – MG  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RENATA VIANA ABREU

EFEITO PROMNÉSICO E ANTIOXIDANTE  
DO CAFÉ NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL  
DE RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientador: Tasso Moraes e Santos  
Co-orientadora: Grace Schenatto Pereira

Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte – MG  
2009

Dedico este trabalho ao meu marido Alexandre que é amigo e companheiro de todas as horas e está sempre ao meu lado, dividindo os momentos de alegria e sacrifício.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia, pelo Dom da Vida.

Ao professor Tasso Moraes e Santos, orientador e amigo, pelas oportunidades oferecidas, pela dignidade com que direciona o trabalho e pelos ensinamentos que tanto contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Grace Schenatto Pereira, pela atenção, disponibilidade e co-orientação, fundamentais para a concretização deste estudo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia - UFMG, pela contribuição em minha formação científica.

Ao professor Dr. Jiang-Fan Chen e todos os colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do Departamento de Neurologia da Universidade de Boston, pela acolhida, paciência e pelos ensinamentos transmitidos sempre com toda boa vontade.

Aos amigos do laboratório de Nutrição Experimental, Marclênia, Wagner, Silmara, Vinícius, Gustavo, e em especial à Eliane, pela amizade, colaboração e pelo convívio sempre agradável.

À Maria da Graças Torquato, pela disponibilidade, apoio e amizade.

Aos professores e colegas do Núcleo de Neurociências – NNC – pela disponibilidade e ajuda nos testes comportamentais.

À professora Maria das Graças Carvalho e aos alunos do Laboratório de Hematologia Clínica, pela disponibilidade e colaboração nas leituras no aparelho de ELISA.

Aos colegas do curso de Ciência de Alimentos

Ao José Batista Viturino e Maria Adelaide Fernandes, pela disponibilidade e auxílio na manutenção dos animais utilizados.

Aos meus queridos pais, Wellington e Zulma, modelos em que espelho minha vida, obrigada pelo amor e apoio incondicionais.

Aos meus irmãos, Fabiana e Daniel, e meu cunhado Licínio, pela amizade, exemplo e incentivo.

Aos meus sobrinhos Francisco e Felipe, que me trouxeram momentos de alegria e paz quando mais precisava.

Aos órgãos financiadores FAPEMIG, CAPES, CNPq e PRPQ-UFMG.

Aos animais utilizados em prol do desenvolvimento da ciência.

A todos que, de diferentes maneiras, acreditaram, incentivaram e auxiliaram na realização deste trabalho.

*“Deus me conceda falar com propriedade e pensar de forma correspondente aos dons que me foram dados, porque ele é o guia da sabedoria e o orientador dos sábios. Em seu poder estamos nós, as nossas palavras, a nossa inteligência e as nossas habilidades. Ele me concedeu o conhecimento exato de tudo o que existe, para eu compreender a estrutura do mundo e a propriedade dos elementos...”*

(Sabedoria 7, 15-17)

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Café .....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Composição química e atividade biológica .....	19
2.1.2 Cafeína .....	22
<b>2.2 Aprendizagem e Memória .....</b>	<b>26</b>
2.2.1 Conceitos básicos .....	26
2.2.2 Bases celulares e moleculares da memória .....	29
2.2.3 Campo aberto ou open field .....	32
2.2.4 Teste de reconhecimento de objetos .....	32
<b>2.3 Estresse Oxidativo.....</b>	<b>34</b>
2.3.1 Lipoperoxidação .....	36
2.3.2 Mecanismos de defesa antioxidante .....	38
2.3.3 Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas .....	41
<b>2.4 Doenças Neurodegenerativas .....</b>	<b>42</b>
2.4.1 Doença de Alzheimer .....	43
2.4.2 Doença de Alzheimer e estresse oxidativo .....	45
2.4.3 Indução de diabetes por estreptozotocina como modelo para a doença de Alzheimer .....	48
<b>2.5 Café e Aprendizado e Memória .....</b>	<b>49</b>
<b>2.6 Café e Estresse Oxidativo .....</b>	<b>51</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Objetivo geral .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>53</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Protocolo Experimental .....</b>	<b>54</b>
4.1.1 Animais .....	54
4.1.1.1 Bloco A .....	54
4.1.1.2 Bloco B .....	55
<b>4.2 Material .....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Equipamentos.....	56
4.2.2 Reagentes químicos .....	56
4.2.3 Caracterização do café .....	57
<b>4.3 Métodos .....</b>	<b>57</b>
4.3.1 Extração do café .....	57
4.3.2 Preparo das dietas .....	58

4.3.3	Testes comportamentais .....	58
4.3.3.1	Campo aberto (Open field) .....	59
4.3.3.2	Memória de reconhecimento de objetos-preferência por objeto novo ..	59
4.3.4	Medidas bioquímicas .....	61
4.3.4.1	Preparo do homogeneizado de cérebro .....	61
4.3.4.2	Peroxidação de lipídeos .....	61
4.3.4.3	Avaliação da glutatona .....	61
4.3.4.4	Atividade da glutatona-S-transferase .....	62
4.3.4.5	Atividade da glutatona peroxidase .....	62
4.3.4.6	Atividade da glutatona redutase .....	62
4.3.4.7	Atividade da superóxido dismutase .....	63
4.3.4.8	Determinação de proteína .....	63
4.3.4.9	Determinação de DNA .....	64
4.3.5	Medida da A $\beta$ -amilóide (1-40) .....	64
4.3.5.1	Medida da glicose sanguínea .....	64
4.3.5.2	Preparo do homogeneizado de cérebro .....	65
4.3.5.3	Medida da concentração de A $\beta$ -amilóide (1-40) .....	65
<b>4.4</b>	<b>Análise estatística dos dados</b> .....	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
<b>5.1</b>	<b>Consumo diário de ração e efeito da ingestão de café ou cafeína sobre o peso corporal dos ratos – Bloco A</b> .....	<b>67</b>
<b>5.2</b>	<b>Testes comportamentais</b> .....	<b>69</b>
5.2.1	Campo aberto (open field) .....	69
5.2.2	Memória de reconhecimento de objetos- preferência por objeto novo .	70
<b>5.3</b>	<b>Medidas bioquímicas</b> .....	<b>75</b>
5.3.1	Conteúdo de proteína e DNA .....	75
5.3.2	Peroxidação de lipídeos (TBARS).....	77
5.3.3	Conteúdo de GSH .....	77
5.3.4	Atividade enzimática da glutatona-S-transferase (GST) .....	78
5.3.5	Atividade enzimática da glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx) .....	79
5.3.6	Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) .....	81
<b>5.4</b>	<b>Consumo diário de ração e efeito da ingestão de café ou cafeína sobre o peso corporal dos ratos – Bloco B</b> .....	<b>81</b>
<b>5.5</b>	<b>Medida da glicose sanguínea</b> .....	<b>83</b>
<b>5.6</b>	<b>Medida da proteína A<math>\beta</math>-amilóide (1-40)</b> .....	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>98</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição química de grãos de café (arábica e robusta) crus e torrados (g/100g base seca) .....	20
<b>Tabela 2</b> - Alguns exemplos de espécies de radicais livres .....	35
<b>Tabela 3</b> - Teste do campo aberto: número de crossing avaliado em dois dias consecutivos .....	69
<b>Tabela 4</b> - Teste do campo aberto: número de rearing avaliado em dois dias consecutivos .....	70
<b>Tabela 5</b> - Tempo de exploração total na fase treino no teste de preferência por novo objeto .....	71
<b>Tabela 6</b> - Medida da glicose sanguínea dos ratos avaliada após 1 e 5 semanas da indução de diabetes com estreptozotocina .....	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Fases da consolidação da memória .....	28
<b>Figura 2</b> - Diagrama representativo do teste de memória de reconhecimento de objetos – preferência por objeto novo .....	60
<b>Figura 3</b> - Consumo diário médio de ração dos grupos de ratos .....	68
<b>Figura 4</b> - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína sobre o peso corporal dos ratos .....	68
<b>Figura 5</b> - Teste de reconhecimento de objetos do grupo controle .....	71
<b>Figura 6</b> - Teste de reconhecimento de objetos do grupo suplementado com extrato de café 3% .....	72
<b>Figura 7</b> - Teste de reconhecimento de objetos do grupo suplementado com extrato de café 6% .....	72
<b>Figura 8</b> - Teste de reconhecimento de objetos do grupo suplementado com cafeína 0,04% .....	73
<b>Figura 9</b> - Teste de reconhecimento de objetos do grupo suplementado com cafeína 0,08% .....	73
<b>Figura 10</b> - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína na fase treino do teste de memória de reconhecimento de objetos .....	74
<b>Figura 11</b> - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína na fase teste após 90 minutos no teste de memória de reconhecimento de objetos .....	74
<b>Figura 12</b> - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína na fase teste após 24 horas no teste de memória de reconhecimento de objetos .....	75
<b>Figura 13</b> - Conteúdo de proteína no tecido cerebral de ratos submetidos a diferentes tratamentos dietéticos .....	76
<b>Figura 14</b> - Conteúdo de DNA no tecido cerebral de ratos submetidos a diferentes tratamentos dietéticos .....	76
<b>Figura 15</b> - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre índice de peroxidação de lipídeos em tecido cerebral de ratos .....	77
<b>Figura 16</b> - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre o conteúdo de glutatona reduzida (GSH) em tecido cerebral de ratos .....	78
<b>Figura 17</b> - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre a atividade enzimática da glutatona-S-transferase (GST) em tecido cerebral de ratos .....	79
<b>Figura 18</b> - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre a atividade enzimática da glutatona redutase (GR) em tecido cerebral de ratos .....	80
<b>Figura 19</b> - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre a atividade enzimática da glutatona peroxidase (GPx) em tecido cerebral de ratos .....	80
<b>Figura 20</b> - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em tecido cerebral de ratos .....	81
<b>Figura 21</b> - Consumo diário médio de ração dos grupos de ratos .....	82
<b>Figura 22</b> - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína sobre o peso corporal dos ratos .....	83
<b>Figura 23</b> - Níveis de proteína A $\beta$ -amilóide no córtex dos ratos .....	85
<b>Figura 24</b> - Níveis de proteína A $\beta$ -amilóide no hipocampo dos ratos .....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	4-hydroxynonenal	4-hidroxinonenal
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
A $\beta$	$\beta$ -amyloid	$\beta$ -amilóide
AD	Alzheimer's disease	Doença de Alzheimer
apoE	Apolipoprotein E	Apolipoproteína E
APP	Amyloid precursor protein	Proteína precursora da amilóide
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT	Catalase	Catalase
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CGA	Chlorogenic acids	Ácidos clorogênicos
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GABA	Gamma aminobutyric acid	Ácido gama-aminobutírico
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutathione peroxidase	Glutaciona peroxidase
GR	Glutathione reductase	Glutaciona redutase
GSH	Glutathione (reduced form)	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutathione (oxidized form)	Glutaciona oxidada
GST	Glutathione-S-transferase	Glutaciona-S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide	Peróxido de hidrogênio
LTD	Long-term depression	Depressão de longa duração
LTM	Long-term memory	Memória de longa duração
LTP	Long-term potentiation	Potenciação de longa duração
MDA	Malonaldehyde	Malonaldeído
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo- fosfato (forma reduzida)
NaN <sub>3</sub>	Sodium azide	Azida sódica
NO	Nitric oxide	Óxido nítrico
OPT	Orthophthaldehyde	Ortoftaldeído
PGA	Pyroglutamate	Piroglutamato

ROS	Reactive oxygen species	Espécies reativas do oxigênio
SOD	Superoxide dismutase	Superóxido dismutase
STM	Short-term memory	Memória de curta duração
STZ	Streptozotocin	Estreptozotocina
TAR	Total antioxidant reactivity	Reatividade antioxidante total
TBA	Thiobarbituric acid	Ácido tiobarbitúrico
TRAP	Total radical-trapping antioxidant potential	Potencial antioxidante reativo total
UDPGT	UDP-glucuronosyltransferase	UDP-glucuroniltransferase
WM	Work memory	Memória de trabalho
GC	Grupo controle	
G3%	Grupo suplementado com 3% de extrato de café	
G6%	Grupo suplementado com 6% de extrato de café	
G0,04%	Grupo suplementado com 0,04% de cafeína	
G0,08%	Grupo suplementado com 0,08% de cafeína	

## RESUMO

O café é uma bebida de grande popularidade e consumida mundialmente, havendo diferentes estudos concernentes às suas implicações na saúde. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do café, como alimento funcional, sobre o sistema antioxidante cerebral e processos cognitivos de ratos adultos. Foram analisadas, no tecido cerebral de ratos, as atividades das enzimas antioxidantes glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), bem como a peroxidação de lipídeos, a atividade da glutatona-S-transferase (GST) e o conteúdo de glutatona reduzida. Para avaliação da atividade exploratória e locomotora dos animais e do aprendizado e memória, foram utilizados os testes de campo aberto e reconhecimento de objetos, respectivamente. Por fim, foram analisados os níveis da proteína A $\beta$ -amilóide (1-40) no córtex e no hipocampo de ratos controle, com diabetes induzida por estreptozotocina (STZ) e submetidos à suplementação de café e cafeína na dieta. Para isso, cinco grupos de ratos foram utilizados: **grupo controle (GC)**, alimentado *ad libitum*; **grupo café 3% (G3%)**, alimentado como o GC, mas com dieta contendo extrato de café (3%); **grupo café 6% (G6%)**, alimentado como o GC, mas com dieta suplementada com extrato de café (6%); **grupo cafeína 0,04% (G0,04%)**, alimentado com dieta controle suplementada com 0,04% de cafeína e **grupo cafeína 0,08% (G0,08%)**, alimentado com dieta controle suplementada com 0,08% de cafeína. Os resultados indicaram que a ingestão de café ou cafeína diminuiu a peroxidação de lipídeos das membranas cerebrais, aumentou a concentração de glutatona reduzida e a atividade das enzimas antioxidantes GR, SOD e GST. Além disso, melhorou a memória de longo prazo dos animais no teste de reconhecimento de objetos, o que não foi acompanhado de um aumento na atividade exploratória e locomotora dos animais. O consumo de café ou cafeína na dieta não foi capaz de diminuir os níveis de A $\beta$ -amilóide aumentados pela STZ no córtex e no hipocampo dos ratos. Os dados obtidos indicam que o café exerce função promnésica e antioxidante no sistema nervoso central, podendo ser considerado um alimento funcional.

**Palavras chave:** café, cafeína, sistema antioxidante endógeno, aprendizado e memória, proteína A $\beta$ -amilóide.

## ABSTRACT

Coffee is a very popular beverage, consumed worldwide and its effect on health protection is well studied. The goal of the present study was to investigate the effect of coffee, as a functional food, on the cerebral antioxidant system and cognitive processes in rats. The activities of antioxidant enzymes glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase and superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), as well lipid peroxidation and reduced glutathione content were determined. The paradigms of open field and object recognition were used to assess the locomotor and exploratory activity and learning and memory, respectively. Finally, we analyzed the levels of A $\beta$ -amyloid protein (1-40) in the cortex and hippocampus of control and streptozotocin-induced diabetes rats after coffee and caffeine consumption. Five groups of male rats were used: **control group (GC)**, fed *ad libitum*; **coffee group 3% (G3%)**, fed as GC but with the diet containing coffee extract (3%); **coffee group 6% (G6%)**, fed as GC but with the diet containing coffee extract (6%); **caffeine group 0,04% (G0,04%)**, fed with control diet supplemented with 0,04% of caffeine and **caffeine group 0,08% (G0,08%)**, fed with control diet supplemented with 0,08% of caffeine. The results indicated that the intake of coffee or caffeine reduced the lipid peroxidation of brain membranes, increased the concentration of reduced glutathione and the activities of the antioxidant enzymes, GR, SOD and GST. In addition, long-term memory tested on object recognition test was improved, but it was not accompanied by an increase in locomotor and exploratory activity of the animals. The consumption of coffee or caffeine in the diet has not been able to reduce the levels of A $\beta$ -amyloid increased by STZ in the cortex and hippocampus of the rats. The data obtained indicate that coffee has promnesic and cerebral antioxidant effects, therefore, it can be considered as a functional food.

**Key words:** coffee, caffeine, endogenous antioxidant system, learning and memory, A $\beta$ -amyloid protein.

# 1. INTRODUÇÃO

O papel da alimentação equilibrada na manutenção da saúde tem sido alvo de constante interesse, e por isso, inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de certos alimentos na prevenção de doenças vêm sendo realizados (FERRARI, 2004; SCHMITT-SCHILLIG et al., 2005). O café, bebida de grande popularidade, consumida mundialmente, tem sido extensamente estudado como alimento funcional, ou seja, capaz de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos no crescimento, desenvolvimento, manutenção e em outras funções normais do organismo humano, adaptando-o para resistir às adversidades do meio ambiente. Muitas pesquisas têm demonstrado que a cafeína, um dos principais constituintes do café, provoca várias respostas celulares e farmacológicas num largo espectro de sistemas biológicos, como estimulação do sistema nervoso central e atividade motora (FREDHOLM et al, 1999), melhora da performance cognitiva (RIEDEL et al., 1995), atividade antioxidante (SHI et al., 1991; NOSCHANG et al., 2009), entre outras. Além da cafeína, o café contém uma série de outras substâncias, como polímeros fenólicos, ácidos clorogênicos, lípidos e terpenos que possuem diferentes efeitos biológicos, como ação antioxidante (NATELLA et al., 2002; CHO et al., 2009), anticarcinogênica (CAVIN et al., 2002), antimicrobiana (ALMEIDA et al., 2006) e neuroprotetora (HERRAIZ & CHAPARRO, 2006; HWANG & JEONG, 2008).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Baixas concentrações de espécies reativas do oxigênio (ROS) podem ser benéficas ou mesmo indispensáveis em processos biológicos, tais como, vias de sinalização e mecanismos de defesa contra microorganismos. Contudo, altas concentrações de ROS podem ser prejudiciais às células e aos tecidos. Os organismos aeróbios possuem sistemas de defesas antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos que lidam com os radicais livres, como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (MATÉS & SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993). Os danos

oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com o processo de envelhecimento e com a etiologia de várias doenças, como cardiopatias, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (AMES et al., 1993; CHONG et al., 2005). Compostos bioativos da dieta com propriedades antioxidantes são um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem melhorar a saúde e retardar ou mesmo prevenir o surgimento de doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento (FERRARI, 2004).

Como conseqüência do aumento contínuo na expectativa de vida, a população global está envelhecendo e, sendo assim, há previsões para um aumento na incidência de desordens neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (AD). Desse modo, há um interesse crescente na descoberta de novos compostos que ofereçam alívio dos sintomas e melhorem a qualidade de vida dos pacientes. Há um consenso geral da existência de um declínio cognitivo normal na performance da memória do começo para o final da vida adulta e que desordens, como a AD, são associadas a uma piora global das funções cognitivas, entre elas, uma perda de memória sintomática (BERTAINA-ANGLADE et al., 2006).

A memória pode ser definida como o armazenamento e a evocação de uma informação aprendida. Existem diferentes tipos de memória que são armazenadas em diferentes regiões cerebrais (MILNER et al., 1998). É possível acessar estas memórias em animais utilizando diferentes paradigmas comportamentais. O processamento da memória requer a ativação de diversos sistemas para que a informação adquirida seja consolidada (DUDAI, 2004). Além disso, os estudos sobre aprendizagem e memória objetivam estabelecer ligações entre o comportamento animal, os mecanismos fisiológicos ativados e os processos moleculares que suportam estes mecanismos, bem como as regiões cerebrais recrutadas no processamento da memória.

No presente estudo foi abordado o efeito do café, como alimento funcional, sobre a modulação do sistema antioxidante endógeno no cérebro de ratos e sobre a performance cognitiva em animais adultos. Foram analisadas as atividades de enzimas antioxidantes, assim como de outros componentes envolvidos no estresse oxidativo, como a peroxidação de lipídeos e o conteúdo de glutatona reduzida. Além disso, a performance cognitiva de ratos adultos foi avaliada pelos testes de campo aberto e de memória de reconhecimento de objetos. Os níveis da proteína A $\beta$ -amilóide (1-40) no córtex e no hipocampo de ratos controle e ratos com diabetes

induzida por estreptozotocina foram analisados. Objetivou-se testar a hipótese de que o consumo diário de café levaria a uma produção diminuída dessa proteína no cérebro, como consequência, entre outros fatores, de uma modulação do sistema antioxidante endógeno por este alimento, levando, assim, a uma proteção cognitiva. Para este propósito, foram utilizados ratos submetidos a diferentes tratamentos dietéticos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 - Café

O cafeeiro pertence à família botânica Rubiaceae que contém cerca de 500 gêneros e mais de 6000 espécies, sendo que duas espécies são comercialmente exploradas em nível mundial: *Coffea arabica* (Café Arábica), considerada mais nobre, e *Coffea canephora* (Café Robusta), considerada mais ácida, porém mais resistente às pragas. *C. arabica* totaliza 80% da produção mundial, sendo suas variedades as mais apreciadas pelos consumidores de café (SMITH, 1989; PETTIGREW, 1999).

Estima-se que o café seja conhecido há mais de mil anos no Oriente Médio, principalmente na região de Kafa que deu origem à denominação “Café”. Entretanto, o primeiro registro comprovado de sua existência ocorreu por volta do século XV, no ano 1400 d.C. Nessa época, o café foi descoberto por pastores etíopes que observaram que cabras tornavam-se mais espertas e resistentes quando elas comiam uma pequena cereja, o fruto do café. Os árabes, vizinhos ao Oriente médio, foram os primeiros a cultivar o café e a usá-lo como bebida, por isso o nome científico *Coffea arabica*.

Embora os árabes tenham tomado certas medidas para manter o monopólio da produção do café, os holandeses conseguiram contrabandear frutos frescos, e graças a eles, o café começou a ser conhecido no mundo. Levado para a Europa, a partir do século XVII, passou a ser adotado como bebida. O produto só chegou ao Brasil em 1727 sendo cultivado no Vale do Paraíba em São Paulo. O clima e as terras férteis da região transformaram o Brasil no maior produtor mundial de café a partir do final do século XIX (ICO, 2009). Cerca de 86% do café do Brasil são produzidos nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e São Paulo. Minas Gerais é o maior produtor, detendo 47% da produção. Em segundo lugar está o Espírito Santo, com 19% (maior produtor de *Coffea canephora*) e na terceira colocação está São Paulo, com 13%. O Paraná detém a quarta colocação, com 7% da produção do café nacional (DEMARCHI, 2003).

Atualmente, o café tem grande importância na economia mundial. A cultura do café é praticada em todos os continentes. Os principais países produtores

encontram-se na América do Sul (Brasil e Colômbia), América Central e Ásia (Vietnã) (SINDICAFÉ, 2009). No comércio internacional, ele é um dos produtos básicos mais valiosos, em muitos anos só superado em valor pelo petróleo como fonte de divisas para alguns países produtores em desenvolvimento. Além disso, o café é a bebida mais consumida no mundo, e esse fato fez com que, a partir de anos mais recentes, as pesquisas relacionadas às atividades biológicas do café verde e especialmente do café torrado fossem intensamente estimuladas (ABIC, 2009).

### **2.1.1 - Composição química e atividade biológica**

O café é uma mistura complexa de compostos químicos de ocorrência natural e compostos químicos formados durante o processo de torração (DAGLIA et al., 1998). Do ponto de vista químico, o café é uma das bebidas mais complexas. Essa complexidade se deve tanto à presença de uma grande quantidade de compostos químicos, como à possível reação e interação desses compostos durante o processamento (SMITH, 1989). O processo de torração altera a constituição química dos grãos, principalmente pela reação de Maillard, reação de Strecker e por processos de pirólise envolvendo substâncias de alto e baixo peso molecular, alterando a concentração e a estrutura química de diversas substâncias presentes no café. No primeiro grupo estão as proteínas e os polissacarídeos e no segundo grupo a cafeína, trigonelina, ácido clorogênico, ácido caféico e sacarose. Além disso, o processo de torração do café dá origem às mudanças que lhe conferem gosto agradável e aroma característico, produzindo uma das bebidas mais populares do mundo (CLARKE & MACRAE, 1989).

A água é um componente importante do café e seu conteúdo é de 10 a 13% (p/p) no café verde, enquanto o café torrado pode conter até 5% (p/p). O café é capaz de reter água em camadas monomoleculares e polimoleculares, nas superfícies internas e externas, ou por capilaridade através de microporos e macroporos presentes na matriz (CLARKE, 1989).

Na Tabela 1 é apresentada a composição química em grãos crus e torrados de café arábica e robusta. Os carboidratos constituem 50 a 60% do peso do café verde em grão, contendo grupos de polissacarídeos e açúcares de baixo peso molecular, incluindo tri-, di- e monossacarídeos. A sacarose é o açúcar livre presente em maior

concentração no café verde, sendo rapidamente perdida durante a torração, chegando a 100% de degradação na torra escura (CLARKE & MACRAE, 1989).

Tabela 1 - Composição química de grãos de café (arábica e robusta) crus e torrados (g/100g base seca)

Componentes	Árábica		Robusta	
	Verde	Torrado	Verde	Torrado
Minerais	3,0 – 4,2	3,5 – 4,5	4,0 – 4,5	4,6 – 5,0
Cafeína	0,9 – 1,2	~ 1,0	1,6 – 2,4	~ 2,0
Trigonelina	1,0 – 1,2	0,5 – 1,0	0,6 – 0,75	0,3 – 0,6
Lipídeos	12,0 – 18,0	14,5 – 20,0	9,0 – 13,0	11,0 – 16,0
Ácidos Clorogênicos Totais	5,5 – 8,0	1,2 – 2,3	7,0 – 10,0	3,9 – 4,6
Ácidos Alifáticos	1,5 – 2,0	1,0 – 1,5	1,5 – 2,0	1,0 – 1,5
Oligossacarídeos	6,0 – 8,0	0 – 3,5	5,0 – 7,0	0 – 3,5
Polissacarídeos Totais	50,0 – 55,0	24,0 – 39,0	37,0 – 47,0	—
Aminoácidos	2,0	0	2,0	0
Proteínas	11,0 – 13,0	13,0 – 15,0	11,0 – 13,0	13,0 – 15,0

Fonte: CLARKE & MACRAE (1989)

Componentes nitrogenados são todos aqueles compostos que contém nitrogênio orgânico ou inorgânico. Dentre os compostos nitrogenados existentes no café, destacam-se a cafeína, a trigonelina, as proteínas, os aminoácidos, as amins e alguns compostos voláteis (SMITH, 1989).

A presença da trigonelina tem pouca influência na qualidade do café, pois esse composto está presente em pequenas quantidades nos grãos (em torno de 1%). Entretanto, a grande importância da trigonelina se refere aos aspectos nutricionais, pois durante a torração, essa substância é convertida a ácido nicotínico (niacina), fazendo do café uma fonte dessa vitamina na dieta. Durante essa etapa do processamento, a trigonelina é desmetilada para formar niacina, em quantidades que podem chegar a 20 mg por 100 g de café torrado (MAZZAFERA, 1991; MONTEIRO & TRUGO, 2005).

A cafeína é o mais conhecido constituinte do café devido às suas propriedades farmacológicas. É um alcalóide farmacologicamente ativo pertencente ao grupo das xantinas, altamente resistente ao calor, inodoro e com sabor amargo bastante

característico que contribui de forma importante para o sabor e aroma do café (MONTEIRO & TRUGO, 2005). O café robusta, em geral, apresenta uma maior concentração de cafeína, numa média de 2,2%, enquanto o valor para o café arábica é de 1,2%. Durante o processo de torração, as perdas de cafeína são relativamente modestas (CLARKE & MACRAE, 1989).

O conteúdo de lipídeos nos grãos de café depende da espécie. Grãos do café arábica possuem 15% de lipídeos em sua constituição, e o café robusta apenas 10%. Os triglicérides representam a maior porcentagem dos lipídeos totais, cerca de 75%, havendo ainda a presença de ácidos graxos livres, sendo os predominantes os ácidos palmítico e linoléico; diterpenos, como o caveol e o cafestol; esteróis, tocoferóis, entre outros (CLARKE & MACRAE, 1989).

Os diterpenos cafestol e caveol estão presentes no grão e no café como bebida. A concentração destes compostos na bebida depende fortemente do procedimento de preparo, aparecendo em quantidade mais elevada em cafés não-filtrados, como o café turco ou escandinavo, em menor valor no café expresso e praticamente inexistente no café filtrado (GROSS et al., 1997). Estes diterpenos são também considerados bons exemplos de constituintes biologicamente ativos encontrados no café. Estudos mostram que esses compostos aumentam a atividade da enzima alanina amino transferase (URGERT et al., 1997), protegem o cólon e outros órgãos contra a formação de aductos de DNA e induzem a desintoxicação de xenobióticos (HUBER et al., 2003). Os efeitos antimutagênicos e anticarcinogênicos que têm sido observados com o caveol e o cafestol podem ser explicados, principalmente, pela indução de modificações benéficas no metabolismo de xenobióticos, induzindo as enzimas de conjugação, como a glutathione transferase (GST) e UDP-glucuroniltransferase (UDPGT), e provocando um aumento dose-dependente na concentração intracelular de GSH (CAVIN et al., 2002; HUBER et al., 2002).

Cafés verdes contêm uma grande variedade de polifenóis a exemplo do ácido clorogênico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico. Os ácidos clorogênicos (CGA) e compostos relacionados são os principais componentes da fração fenólica dos grãos de café verde, alcançando teores de até 14% em peso seco (FARAH & DONANGELO, 2006), enquanto o conteúdo no café torrado pode atingir até 7% da composição (TRUGO & MACRAE, 1984). Os CGA determinam as variações das características químicas e a formação de aroma durante o processamento do café.

Entre as funções dos CGA na fisiologia do cafeeiro, destacam-se: o controle do nível do ácido indol acético, a proteção contra infecção microbiana e insetos predadores, além de serem precursores da biossíntese da lignina (CLIFFORD, 1989).

Estudos têm mostrado os efeitos anticarcinogênico do ácido clorogênico no intestino grosso e fígado, além de exercer ação protetora e antioxidante (DAGLIA et al., 2000), provocar alterações na circulação sanguínea e inibir a oxidação de LDL *in vitro*, protegendo assim o organismo contra doenças cardiovasculares (OLTHOF et al., 2001). A fração não absorvida, no cólon, inibe a formação de compostos mutagênicos N-nitrosos (nitrosaminas) exercendo assim efeito anticancerígeno (MORI et al., 2000).

O aroma do café é formado por uma mistura complexa de compostos voláteis que apresentam concentrações diferentes e, por isso, a sua contribuição para o aroma final do café é bem variada, podendo inclusive ocorrer interações sinérgicas e antagônicas entre os mesmos. No café torrado, grande parte dos compostos voláteis é produto da reação de Maillard que ocorre durante a etapa de torração (MOREIRA & TRUGO, 2000).

O café possui uma variedade de efeitos sobre a função cerebral, atuando como um estimulador do sistema nervoso central. Alguns estudos relatam que o aroma do café afeta as ondas cerebrais e o fluxo sanguíneo (YAMATO et al., 2002).

O estudo de todos esses compostos do café é extremamente complexo e merece atenção por parte dos pesquisadores. Os esforços nessa área estão direcionados para a pesquisa de compostos com atividades biológicas tais como, atividade antioxidante, anticarcinogênica, neuroprotetora, naturalmente presentes no café ou resultantes de reações durante o processamento.

### **2.1.2 - Cafeína**

A cafeína é um alcalóide farmacologicamente ativo pertencente ao grupo das xantinas, altamente resistente ao calor, inodoro e com sabor amargo bastante característico (MONTEIRO & TRUGO, 2005).

A cafeína é absorvida no sangue e tecidos corporais 5 minutos após a ingestão, sendo que em aproximadamente 30 minutos, sua concentração alcança o pico máximo no sangue, apresentando uma meia-vida de aproximadamente 4 horas.

A cafeína é altamente lipossolúvel e por isso atravessa a barreira hematoencefálica rapidamente, o que leva ao pico de concentração no cérebro em apenas alguns minutos após a ingestão. Os níveis cerebrais permanecem estáveis por no mínimo uma hora, com um clearance lento de 3 a 4 horas, ou mais (NEHLING et al., 1992). A cafeína como um leve estimulante afeta o cérebro aumentando a atividade neural (PAPADELIS, et al., 2003). Resultados de estudos sugerem que a cafeína melhora o desempenho físico e intelectual prejudicial produzido pela fadiga, por uma noite de trabalho e pela privação do sono e aumenta o estado de alerta e a ansiedade, melhora a atenção e a recuperação da memória (SMITH et al., 2003; HASKELL et al., 2005).

A cafeína é largamente conhecida por causar efeitos bifásicos na locomoção, com doses menores aumentando e doses maiores diminuindo a atividade locomotora. Doses maiores de cafeína também estão associadas aos efeitos negativos no organismo, podendo induzir dificuldade para dormir ou distúrbios no sono, aumento da ansiedade e ataques de pânico em pacientes susceptíveis (CLEMENTZ & DAILEY, 1988).

O principal mecanismo de ação da cafeína é sua ligação aos receptores de adenosina, agindo como antagonista da adenosina nesses receptores (FREDHOLM et al., 1999).

A adenosina é um nucleosídeo purínico, sendo considerada um metabólito envolvido em vias chaves do metabolismo primário existente em todas as células, sendo liberada aparentemente por todas, incluindo neurônios e glia. A adenosina não é estocada nem liberada como um neurotransmissor clássico, já que não se acumula em vesículas sinápticas, sendo liberada do citoplasma para o espaço extracelular através de transportadores de nucleosídeos, que também medeiam sua recaptação. Outra fonte de adenosina extracelular é a hidrólise de nucleotídeos adenina em adenosina, através de uma série de ectoenzimas (RIBEIRO et al., 2003).

A adenosina se comporta como uma molécula de sinalização extracelular, influenciando a transmissão sináptica, sem ser um neurotransmissor, isto é, modula a atividade do sistema nervoso em nível celular pré-sinápticamente, inibindo ou facilitando a liberação de transmissores; pós-sinápticamente, hiperpolarizando ou despolarizando neurônios, e/ou exercendo efeitos não-sinápticos, como nas células da glia. Sendo assim, a adenosina pertence ao grupo dos neuromoduladores (RIBEIRO et al., 2003). Junto a esses efeitos neuromoduladores diretos, a adenosina

tem também ações indiretas no sistema nervoso, demonstrado por estudos das interações entre receptores. É proposto que a adenosina aja como um ajuste fino, fazendo parte de uma sofisticada relação entre seus próprios receptores e receptores de outros neurotransmissores e neuromoduladores (SEBASTIÃO & RIBEIRO, 2000).

A neuromodulação da adenosina é exercida pela ativação de receptores de alta afinidade –  $A_1$  e  $A_{2A}$  – que são provavelmente os de maior importância fisiológica, e de receptores de baixa afinidade –  $A_{2B}$  – que são mais relevantes em condições patológicas. O receptor  $A_3$  é de alta afinidade em humanos, mas tem uma baixa densidade na maioria dos tecidos. Todos eles pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G. O receptor de adenosina  $A_1$  é altamente expresso no córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e região dorsal da medula espinhal. O receptor  $A_{2A}$  é principalmente expresso nos neurônios GABAérgicos da região estriato-palidal e no bulbo olfatório, sendo também expresso em níveis menores em outras regiões do cérebro. O receptor  $A_{2B}$  possui níveis baixos de expressão no cérebro e o  $A_3$  tem níveis intermediários de expressão no hipocampo e cerebelo humano. Os receptores de adenosina também estão presentes no sistema nervoso periférico, autonômico e somático (FREDHOLM et al., 2001).

Apesar de a adenosina não ser considerada um neurotransmissor, ela compartilha, via ativação dos receptores  $A_1$ , muitas propriedades atribuídas ao maior neurotransmissor inibitório, o ácido gama-aminobutírico (GABA). Desse modo, adenosina e GABA constituem moléculas chave no controle da transmissão sináptica glutamatérgica no sistema nervoso central (RIBEIRO et al., 2003). Além disso, excitação direta dos terminais nervosos do GABA pela adenosina pode ocorrer via receptores  $A_{2A}$ . Na verdade, o receptor  $A_{2A}$  de adenosina parece ser um dos únicos sistemas neuromoduladores pré-sinápticos capaz de aumentar a liberação evocada de GABA nos terminais nervosos do hipocampo, sendo esse efeito impedido por antagonistas do receptor  $A_{2A}$  (CUNHA & RIBEIRO, 2000).

Os níveis de adenosina extracelular são usualmente suficientes para ativar receptores inibitórios. As ações excitatórias da cafeína, que é um antagonista não-seletivo de receptores de adenosina, são explicadas pelo antagonismo dessa inibição. Conforme DUNWIDDIE e MASINO (2001), é interessante notar que, ao contrário dos receptores da maioria dos neurotransmissores, que ao serem antagonizados têm conseqüências patológicas, no caso do antagonismo de

receptores de adenosina, aparentemente há uma melhora na função mental e na performance.

A cafeína é capaz de bloquear os efeitos da adenosina nos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  em baixas concentrações, alcançadas após o consumo de uma única xícara de café. Porém, efeitos celulares da cafeína no cérebro, somente ocorrem em concentrações bem mais altas do que as obtidas no consumo humano normal de cafeína. Por exemplo, para inibir a quebra de nucleotídeos, via inibição de fosfodiesterases, são necessárias concentrações 20 vezes maiores do que as doses usuais de consumo humano; e para mobilizar depósitos de cálcio intracelular, concentrações 100 vezes maiores são necessárias (FREDHOLM et al., 1999).

Embora a ação primária da cafeína seja bloquear receptores de adenosina, isso leva a um segundo efeito muito importante sobre muitas classes de neurotransmissores incluindo adrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, glutamato e GABA (FREDHOLM et al., 1999), influenciando um grande número de diferentes funções fisiológicas.

Há vários estudos mostrando que a cafeína aumenta os efeitos relacionados à dopamina. GARRET & GRIFFITHS (1997) reviram evidências da função da dopamina nos efeitos da cafeína. Eles concluíram que os efeitos agonistas nos receptores de dopamina provocados pela cafeína são devidos a uma ação indireta nos receptores de dopamina, que são antagonistas secundários de receptores de adenosina. Estudos demonstram que a cafeína aumenta a quantidade de adrenalina e noradrenalina secretada pela medula adrenal (PAPADELIS et al., 2003) e aumenta a razão de síntese e turnover de noradrenalina central no córtex cerebral, conseqüentemente aumentando os níveis de estimulação e vigilância (SMITH et al., 2003).

## 2.2 - Aprendizagem e memória

### 2.2.1 - Conceitos básicos

Aprendizagem é o processo pelo qual nós adquirimos conhecimento sobre o mundo, enquanto memória é o processo pelo qual o conhecimento é codificado, retido e, posteriormente, recuperado (KANDEL et al., 2003).

A informação de como realizar alguma coisa se denomina memória implícita (também chamada de memória não-declarativa), uma memória que é recordada inconscientemente. A memória implícita envolve o treinamento de habilidades reflexas motoras ou perceptuais e está sob o controle do corpo estriado e suas conexões. O conhecimento factual de pessoas, lugares e coisas e o que esses fatos significam é chamado de memória explícita (ou memória declarativa). Ela é recordada consciente e deliberadamente. A memória declarativa depende da integridade do hipocampo e estruturas relacionadas do lobo temporal e proporciona a capacidade de recordações conscientes sobre fatos e eventos (MILNER et al., 1998). A memória explícita é extremamente flexível e envolve a associação de vários pedaços e peças de informação. Ao contrário, a memória implícita é mais rígida e fortemente conectada às condições de estímulo originais sob as quais a aprendizagem ocorreu (KANDEL et al., 2003). Embora as memórias sejam didaticamente classificadas e separadas umas das outras, cabe salientar que memórias implícitas e explícitas nem sempre são independentes.

TULVING & SCHACTER (1990) desenvolveram a ideia em que a memória pode ainda ser classificada como episódica, uma memória para eventos e experiências pessoais, ou semântica, uma memória para fatos. As memórias semânticas e episódicas são declarativas, porque os humanos as podem descrever ou declarar em detalhe e são processadas por circuitos cerebrais que incluem o hipocampo e suas conexões: amígdala e regiões corticais, tais como córtices entorrinal e cingulado (IZQUIERDO, 2002).

A memória, semântica ou episódica, é o resultado de pelo menos três tipos de processamento distintos, mas relacionados entre si: aquisição, consolidação e evocação.

A aquisição ou aprendizagem refere-se aos processos pelos quais novas informações aprendidas são tratadas e processadas por sistemas neurais específicos, quando encontradas pela primeira vez.

Em seguida, tem-se a consolidação, ou seja, a fixação e o armazenamento de uma informação recém adquirida ou aprendida. Refere-se àqueles processos que alteram a informação recém retida e ainda lábil, de modo a torná-la mais estável para a retenção em longo prazo. A consolidação envolve a expressão de genes e a síntese de novas proteínas, dando origem a alterações estruturais que mantêm a estabilidade da memória ao longo do tempo. O termo consolidação é usado na literatura para se referir a dois tipos de processo. Um é realizado dentro dos primeiros minutos às primeiras horas após o fim da codificação. Evidências indicam que esse tipo de processo relativamente rápido ocorre em determinados locais nos circuitos neuronais que codificam a memória. O outro tipo de processo de consolidação leva semanas, meses ou até anos para se realizar. Acredita-se que envolva reorganização de circuitos cerebrais, ou sistemas, que codificam a memória, podendo se espalhar para novos locais no cérebro (DUDAI, 2004).

À última etapa dá-se o nome de evocação ou lembrança, que se refere àqueles processos que permitem a lembrança e o uso das informações retidas. Embora algumas evocações de memória ocorram de forma espontânea, como resultados de uma flutuação na atividade neural, a evocação usualmente ocorre como resultado da integração entre a chegada da informação do meio ambiente com a rede de memórias já existentes. A evocação da memória leva à formação de novas memórias, combinadas com as memórias anteriores (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000).

A memória também pode ser classificada de acordo com o tempo de retenção, como memória de trabalho (*working memory*, WM), memória de curta duração (*short-term memory*, STM) e memória de longa duração (*long-term memory*, LTM). As memórias declarativas não são estabelecidas em sua forma definitiva logo após a aquisição. Ao contrário, elas são submetidas a um prolongado processo de consolidação dependente de síntese de proteína, onde o sinal frágil e vulnerável é progressivamente estabilizado em uma memória de longa duração (LTM) (ROSSATO et al., 2007). Já havia sido proposto que enquanto a formação da LTM estaria se desenvolvendo, um ou mais sistemas de memória de curta duração estariam em processamento. IZQUIERDO e colaboradores (1999) demonstraram que o conceito

que a STM é só uma passagem para a LTM certamente está errado, assim como o de que a WM constituiria de qualquer forma uma STM. Em seus estudos, eles concluíram que WM, STM e LTM são reguladas por subsistemas separados no cérebro, que em alguns casos pertencem a diferentes estruturas cerebrais. Evidência de que algumas drogas podem seletivamente bloquear a memória de curta (de segundos a horas), mas não a de longa duração (de horas a meses) sugere que os estágios destas memórias são baseados em processos independentes que agem em paralelo. Além disso, memórias mais duradouras provavelmente envolvem interações de sistemas cerebrais que reorganizam e estabilizam diferentes conexões (MCGAUGH, 2000).

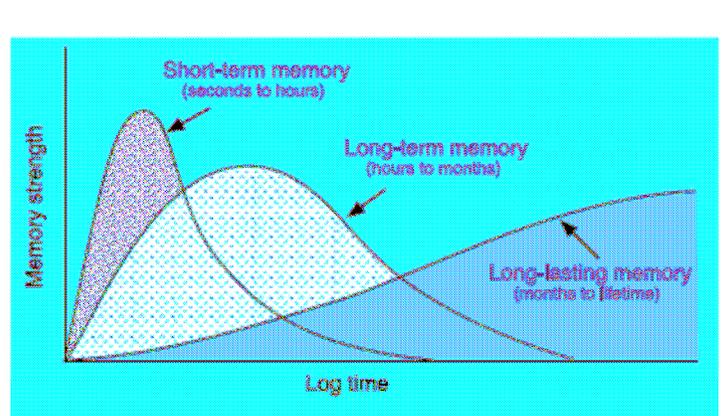


Figura 1 - Fases da consolidação da memória (MCGAUGH, 2000)

Diversos estudos em pacientes amnésicos levaram a uma análise intensa do papel do lobo temporal medial no aprendizado e na memória de humanos e não-humanos. Destes estudos, resultou uma vasta literatura implicando as estruturas do lobo temporal medial de mamíferos na mediação do processamento da memória declarativa. Essas estruturas incluem o hipocampo, assim como as estruturas anatomicamente relacionadas dos córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal, que tem sido sugerido funcionar como o “sistema de memória do lobo temporal medial” (SQUIRE & ZOLA-MORGAN, 1991). Recentemente, estudos de neuroimagem têm demonstrado que as estruturas do lobo temporal medial são ativadas durante a aquisição e recuperação da memória e que cada estrutura contribui de forma distinta para a performance da memória. Foram encontradas diferenças, por exemplo, na atividade dos córtices perirrinal e parahipocampal em testes para a memória visual de objetos e para o reconhecimento espacial, sendo que

a região anterior do córtex parahipocampal somente foi ativada em testes de memória espacial, enquanto o córtex perirrinal foi ativado em ambos os testes (BUFFALO et al., 2006).

IZQUIERDO et al. (2004) apontam o hipocampo como a principal estrutura responsável pela consolidação, recuperação e extinção de diversos testes de memória executados em animais e humanos. Entretanto outras estruturas encefálicas também são responsáveis na consolidação de certos tipos de memória, como a amígdala, várias regiões do córtex, o núcleo accumbens e o estriado. BRIONE (1993) talvez tenha sido o primeiro a formalmente afirmar que a consolidação não é o resultado da operação de uma única estrutura, mas de várias estruturas ligadas umas as outras e com o hipocampo, formando uma verdadeira rede neural.

### **2.2.2 - Bases celulares e moleculares da memória**

A suposição de que a informação é armazenada no cérebro como mudanças na eficiência sináptica foi proposta por Ramón e Cajal um século atrás. A comunicação entre neurônios depende de junções especializadas, chamadas sinapses. No final dos anos 1940, Hebb e Konorski refinaram essa idéia e propuseram uma regra como a base da memória, na qual a sinapse entre duas células é reforçada se as células estão ativas ao mesmo tempo, ou seja, as memórias são adquiridas e armazenadas sob a forma de alterações na eficiência de conexões sinápticas entre neurônios ativados durante o aprendizado (HEBB, 1949). Em 1973, Bliss & Lomo demonstraram pela primeira vez um aumento na magnitude do sinal sináptico de longa duração no hipocampo que poderia durar horas, dias ou mesmo semanas, o que mais tarde ficou conhecido como potenciação de longa duração (LTP).

No hipocampo, a LTP ocorre somente se o neurônio pós-sináptico está ativo (despolarizado) em coincidência com a liberação de neurotransmissores pré-sinápticos. A LTP é um aumento na eficiência sináptica resultante de um estímulo de alta frequência em neurônios pré-sinápticos (BLISS & LOMO, 1973). Logo após a sua descoberta, a LTP foi reconhecida como um mecanismo básico para o armazenamento da memória no cérebro. No entanto, em geral, a LTP é medida *in vitro*, e por isso não reflete as numerosas modulações tanto de sua aquisição como

de sua manutenção ou evocação, fazendo com que não possa ser tida como um modelo total da memória, mas sim como um modelo parcial medido em nível eletrofisiológico (IZQUIERDO, 2002; SILVA et al., 2000). Recentemente, WITHLOCK et al. (2006) demonstraram que o teste comportamental de esQUIVA inibitória em ratos produz as mesmas mudanças nos receptores de glutamato hipocampais do que as induzidas pela LTP medidas eletrofisiologicamente e causam um aumento espacialmente restrito na amplitude da transmissão sináptica evocada na região CA1 do hipocampo *in vivo*. Sendo assim, concluíram que o aprendizado associado à tarefa de esQUIVA inibitória induz, de fato, a LTP na região CA1 do hipocampo.

As alterações sinápticas podem ocorrer através de um outro fenômeno conhecido como depressão de longa duração (LTD), que é uma forma de plasticidade sináptica de longa duração com potencial de ser tão significativa quanto a LTP no desenvolvimento do circuito neural dependente de atividade e no armazenamento da memória em adultos (STANTON, 1996). A LTD compreende uma persistente redução na eficiência sináptica, a qual ocorre tipicamente depois de repetidas estimulações aferentes de baixa frequência. A LTD na região CA1 do hipocampo pode ser associada com a aquisição de memória em ratos e também pode ser aumentada em condições de estresse. Isso sugere um papel mais complexo para esta forma de plasticidade do que simplesmente servir para a prevenção da saturação sináptica, como, por exemplo, revertendo a LTP. Uma possibilidade é que a LTD possa estar diretamente envolvida na criação de traços de memória. Outra hipótese é que a LTD possa preparar a sinapse para a expressão da LTP, contribuindo, assim, indiretamente para o armazenamento da informação. O fato é que existem evidências de que a LTD não seja mecanisticamente o reverso da LTP. Apesar de existirem alguns processos em comum, estudos moleculares, bioquímicos, eletrofisiológicos e farmacológicos apontam para mecanismos distintos de indução e manutenção para esta forma de plasticidade sináptica (BRAUNEWELL & MANAHAN-VAUGHANS, 2001).

A consolidação da memória em diferentes regiões do cérebro provavelmente ocorre por diferentes tipos de cascatas moleculares (revisado por IZQUIERDO et al., 2006). Na região CA1 do hipocampo, a forma de plasticidade envolvida na consolidação da memória é algo muito similar à LTP, ou, de fato, o fenômeno da LTP. Em outras estruturas, as seqüências de processos moleculares são diferentes daqueles descritos na LTP. Entretanto, os receptores envolvidos (particularmente o

receptor NMDA de glutamato) e a função das enzimas envolvidas (particularmente suas relações com a ativação de receptores, fosforilação da CREB, expressão de genes e síntese de proteínas) na LTP têm um papel nos eventos plásticos nas outras regiões cerebrais. É possível que cada estrutura cerebral processe um aspecto informacional diferente de cada tipo de teste, mas isso ainda precisa ser provado.

Um dos mecanismos subjacentes à plasticidade no cérebro de adultos é a neurogênese, ou seja, a adição de novos neurônios aos já existentes circuitos neurais. A neurogênese continua durante a vida adulta no bulbo olfatório e giro dentado do hipocampo em mamíferos, incluindo humanos (ERIKSSON et al., 1998). A plasticidade fornecida por novos neurônios gerados, provavelmente medeia aspectos do aprendizado e da memória. SHORS et al. (2001) mostraram que a redução no número de novos neurônios gerados no giro dentado da formação hipocampal piora a formação de tipos de memória associativa dependentes do hipocampo. Esses resultados sugerem que neurônios imaturos no cérebro de adultos estão envolvidos e talvez sejam necessários para a aquisição de novas memórias dependentes do hipocampo. Testes de aprendizado, meio ambiente estimulante (KEMPERMANN et al., 1997), exercício físico e antidepressivos (MALBERG et al., 2000) aumentam a neurogênese, enquanto o envelhecimento (KUHN et al., 1996), estresse (GOULD et al., 1997) e privação de sono (GUZMAN-MARIN et al., 2005) diminuem a neurogênese hipocampal. Portanto, fatores comportamentais e farmacológicos que modulam a neurogênese em adultos podem, por sua vez, ter importante influência no aprendizado e na memória.

Resultados de estudos recentes têm indicado que fatores neurotróficos são importantes para a consolidação e evocação da memória. Entre eles, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) sem dúvida possui um papel no desenvolvimento, suporte trófico e na plasticidade neural no hipocampo de mamíferos. Estudos mostram que a expressão do BDNF é aumentada após testes de memória dependentes do hipocampo e que animais com níveis diminuídos de BDNF ou de seu receptor, TrkB, são deficientes em testes comportamentais (HELDT et al., 2007).

Durante anos, a consolidação da memória em diferentes testes tem demonstrado requerer a síntese de proteína no hipocampo. MATTHIES (1989) demonstrou que a síntese de RNA e proteína ocorre duas vezes após a sessão de treino, primeiro logo após a aquisição e de novo 3 a 6 horas depois, e que ambas são

necessárias para a consolidação. Esse ponto foi recentemente reexaminado por IGAZ et al. (2002), que descreveu que não só a síntese de proteína, mas também a expressão de genes é necessária nesses dois períodos críticos.

### **2.2.3 - Campo aberto ou open field**

A tarefa mais utilizada para avaliar a habituação em ratos chama-se campo aberto ou “open field”. É um tipo de aprendizado não-associativo, que descreve a alteração de um comportamento em resposta a um único estímulo (PEREIRA, 2005). Esse tipo de tarefa também serve para analisar as atividades exploratórias e locomotoras do animal colocado no quadrante esquerdo superior de uma caixa de acrílico com as paredes pretas e o piso dividido em 16 quadrados de iguais dimensões. O número de linhas cruzadas (“crossing”) e o número de vezes que o animal se levanta nas patas traseiras (“rearing”) são contados durante 5 minutos e tomados como um indicativo de atividade locomotora e exploratória (PEREIRA et al., 2005).

### **2.2.4 - Teste de reconhecimento de objetos**

O teste de reconhecimento de objetos consiste de dois componentes: recordação e familiaridade. A recordação envolve lembrança de detalhes contextuais específicos sobre um episódio anteriormente aprendido; e familiaridade envolve o simples conhecimento que um item foi apresentado, sem ter disponível qualquer informação adicional sobre o episódio aprendido (ENNACEUR & DELACOUR, 1988).

Em contraste com a memória não declarativa que normalmente requer uma fase de aquisição mais intensa, a memória declarativa é adquirida com relativamente poucas exposições ao material a ser aprendido. Este aspecto da memória declarativa é a base para um dos testes mais comuns de reconhecimento de objetos.

Tipicamente, o teste de reconhecimento de objetos, feito em uma arena aberta, consiste em uma fase treino e uma fase teste, separadas por um tempo de retenção variável. Na fase treino, os ratos são introduzidos na arena que contém dois objetos idênticos. Os ratos exploram esses objetos por um determinado limite de tempo,

antes de serem retirados da arena. Ao final do tempo de retenção, os ratos são reintroduzidos na arena que agora contém uma cópia do objeto apresentado anteriormente na fase treino e um novo objeto nunca antes visto pelo animal. Os ratos preferencialmente exploram mais o novo objeto nesta fase de teste, e esse comportamento é convertido em um índice de discriminação dos objetos (WINTERS et al., 2008).

Nos últimos anos, o teste de reconhecimento de objetos tem sido extensamente utilizado para testar os efeitos de intervenções farmacológicas e genéticas na memória (BERTAINA-ANGLADE et al., 2006; HELDT et al.; 2007). Esse teste consiste em quantificar o comportamento natural de roedores em rapidamente se aproximar e explorar um novo objeto ao invés de um velho objeto. Assim, esse teste lida com a motivação natural dos animais em explorar o novo, um instinto inato que leva os animais a aprender sobre seus ambientes (COSTA et al., 2008a).

Os primeiros estudos sugeriam que somente o hipocampo e/ou a amígdala eram vitais para o teste de reconhecimento de objetos. Entretanto, pesquisas subseqüentes demonstraram uma contribuição importante das regiões corticais adjacentes do lobo temporal medial na performance dos testes de reconhecimento de objetos (WINTERS et al., 2008). ZOLA-MORGAN et al (1989) mostraram que lesões restritas aos córtices peririnal e parahipocampal eram suficientes para causar déficits tão extensos quanto os observados depois de lesões no hipocampo e na amígdala. Na verdade, dentre as regiões do lobo temporal medial, as disfunções no córtex peririnal causam maior déficit no reconhecimento de objetos (BUFFALO et al., 1998). Além disso, estudos mais recentes indicaram que o córtex insular é também uma importante estrutura cerebral envolvida na consolidação da memória de reconhecimento (BERMUDEZ-RATTONI et al., 2005).

A questão se diferentes regiões do lobo temporal contribuem da mesma forma para as informações de familiaridade e contexto na memória de reconhecimento ainda é um assunto de muita controvérsia. Alguns resultados (BUSSEY et al., 1999; WINTERS et al., 2004) seguem que o córtex peririnal é criticamente envolvido na discriminação da familiaridade, mas não na memória contextual, enquanto o hipocampo parece sustentar a memória contextual (recordação), mas não ser necessário para a discriminação da familiaridade.

Em um estudo utilizando uma droga bloqueadora de síntese protéica (anisomicina) e dois protocolos diferentes que avaliavam somente o reconhecimento

do objeto ou o reconhecimento do objeto em contextos diferentes, BALDERAS et al. (2008) demonstraram que quando a droga era micro-infundida nos córtices perirrinal e insular havia uma piora na consolidação da memória no reconhecimento do objeto, mas não no objeto em seu contexto. Ao contrário, a administração de anisomicina no hipocampo bloqueava a consolidação da memória de reconhecimento do objeto no contexto, mas não do objeto em si. Outro ponto interessante do estudo é que o bloqueio da síntese protéica só teve efeito quando avaliado na memória de longa duração, parecendo indicar que a síntese de proteínas não está diretamente envolvida na memória de curta duração.

### 2.3 - Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando radicais livres de oxigênio são gerados em excesso pela redução do oxigênio. As espécies reativas do oxigênio (ROS) consistem de radicais livres de oxigênio e entidades associadas que incluem superóxido, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete, óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (CHONG et al., 2005) (Tabela 2). Muitas dessas espécies são geradas em baixos níveis, durante condições fisiológicas normais, em resposta a estímulos internos e externos. Baixos níveis de ROS podem ser indispensáveis em diversos processos, incluindo sinalização intracelular de proliferação ou apoptose, imunidade e defesa contra microorganismos. Por outro lado, altas concentrações ou remoção inadequada das ROS por sistemas antioxidantes endógenos resultam em estresse oxidativo, que pode causar disfunções metabólicas severas e danos a macromoléculas biológicas. Ou seja, as células normalmente são capazes de balancear a produção de oxidantes e antioxidantes para manter um equilíbrio de oxi-redução. O estresse oxidativo ocorre quando esse equilíbrio é quebrado pelo excesso de ROS e/ou pela depleção das defesas antioxidantes (MATÉS & SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999).

Os radicais livres são moléculas altamente instáveis, com meia vida curtíssima e quimicamente muito reativos.

Tabela 2 - Alguns exemplos de espécies de radicais livres

$^1\text{O}_2$	oxigênio singlete
$\text{O}_2^-$	radical superóxido
$\text{OH}^\cdot$	radical hidroxila
$\text{NO}^\cdot$	óxido nítrico
$\text{ONOO}^-$	peroxinitrito
$\text{Q}^\cdot$	radical semiquinona

FONTE: BIANCHI & ANTUNES (1999)

O radical superóxido é o radical livre de oxigênio mais comum e produz peróxido de hidrogênio por desmutação. O radical hidroxila é o radical livre de oxigênio mais ativo e é gerado do peróxido de hidrogênio pela reação de Haber-Weiss, na presença de ferro. O radical hidroxila também pode ser formado através da interação entre o radical superóxido e o óxido nítrico. O óxido nítrico interage com o radical superóxido para formar peroxinitrito que pode levar à geração de ácido peroxinitroso. O radical hidroxila é produzido pela decomposição espontânea do ácido peroxinitroso (CHONG et al., 2005).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação. Entre as principais formas reativas de oxigênio, o  $\text{O}_2^-$  apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o  $\text{OH}^\cdot$  mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana celular e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

O estresse oxidativo no cérebro ocorre quando a geração de ROS supera a habilidade dos sistemas antioxidantes endógenos em remover o excesso de ROS, levando em consequência ao dano celular. Diversas características celulares do cérebro sugerem que ele é altamente sensível ao estresse oxidativo, como, por exemplo, possuir o maior índice metabólico de oxigênio entre todos os órgãos do organismo (MAIESE, 2002). O cérebro consome aproximadamente 20% da quantidade total de oxigênio do organismo. Esta alta taxa metabólica leva a uma probabilidade aumentada de níveis excessivos de ROS serem produzidos. Além

disso, os tecidos cerebrais contêm grandes quantidades de ácidos graxos insaturados que podem ser metabolizados por radicais livres de oxigênio. Por fim, o cérebro contém níveis elevados de ferro que podem estar associados com injúrias causadas por radicais livres. Quelantes de ferro lipossolúveis têm demonstrado levar a uma redução nas ROS e proteger os neurônios de isquemia cerebral focal permanente (DEMOUGEOT et al., 2004). Além disso, dado os fatores de risco aumentados da geração de elevados níveis de ROS no cérebro, é interessante notar que esse órgão também sofre de um sistema de defesa inadequado contra o estresse oxidativo, como por exemplo, a atividade da catalase no cérebro ser significativamente menor do que em outros órgãos. Ao comparar a atividade da catalase no cérebro com a sua atividade no fígado, o cérebro contém somente 10% da atividade dessa enzima presente no fígado (FLOYD & CARNEY, 1992).

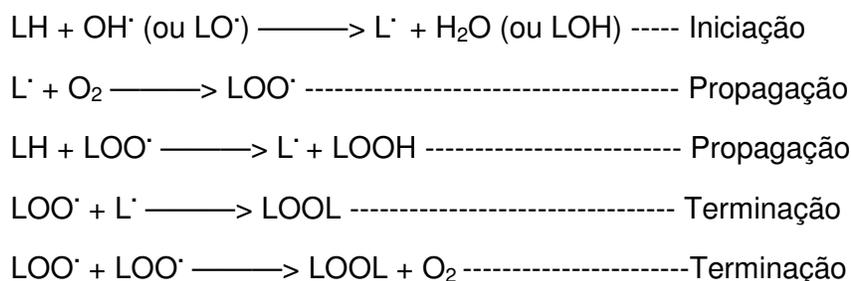
O estresse oxidativo representa uma via significativa que leva à destruição de células neuronais e vasculares no sistema nervoso central. A produção de ROS pode levar à injúria celular através da destruição da membrana lipídica e quebra do DNA (CHONG et al., 2005). As espécies reativas do oxigênio promovem a peroxidação dos lipídeos das membranas celulares (MUKHERJEE et al., 2004); a quebra do DNA durante a hidroxilação da guanina e metilação da citosina e a oxidação de proteínas que geram derivados carbonil de proteína e nitrotirosina (ADAMS et al., 2001). Além dos efeitos deletérios na integridade celular, as ROS podem inibir complexos enzimáticos na cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias, resultando no bloqueio da respiração mitocondrial (YAMAMOTO et al., 2002). No sistema vascular cerebral, os efeitos celulares das ROS podem levar à destruição de membranas de células endoteliais e aumentar a permeabilidade dessas células (SAKAMAKI, 2004).

### **2.3.1 – Lipoperoxidação**

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Consequentemente há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando em morte celular. A lipoperoxidação

também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (MELLO FILHO et al., 1983). Assim como na formação das ROS, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídeo (GARDÈS-ALBERT et al., 1991):



As reações acima se iniciam com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo  $\text{OH}^\cdot$  ou pelo  $\text{LO}^\cdot$  (radical alcóxila), com conseqüente formação do  $\text{L}^\cdot$  (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o  $\text{L}^\cdot$  reage rapidamente com o  $\text{O}_2$ , resultando em  $\text{LOO}^\cdot$  (radical peróxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o  $\text{L}^\cdot$  na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ( $\text{L}^\cdot$  e  $\text{LOO}^\cdot$ ) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se (GARDÈS-ALBERT et al., 1991).

A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcóxila e peróxila), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação. O radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. Entretanto, estudos indicam que o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo (citado por FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

### 2.3.2 - Mecanismos de defesa antioxidante

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES, 1993).

Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes não-enzimáticos, como,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, flavonóides, glutathione; ou enzimáticos, como, a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, entre outras enzimas.

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Além disso, os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

O controle do nível das enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante para a sobrevivência no ambiente aeróbico (BARNETT & KING, 1995). Os organismos eucariotos possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo. Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na dieta é de grande importância e o consumo desses alimentos está relacionado com a

diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (POMPELLA, 1997).

### Glutationa reduzida (GSH)

A glutatona reduzida (GSH, L-gama-glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células sendo o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína (MEISTER & ANDERSON, 1983). A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta (DENEKE & FANBURG, 1989). Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão (SHAN et al., 1990); atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (DENEKE & FANBURG, 1989).

### Glutationa-S-transferase (GST)

A glutatona S-transferase (GST) catalisa a conjugação da glutatona com muitos reagentes eletrofílicos, estando diretamente associada com desintoxicação ou proteção celular (ABRAHAM et al., 1998). Ao mesmo tempo em que desintoxica xenobióticos eletrofílicos, como carcinógenos químicos, poluentes ambientais, agentes antitumorais, estas transferases também inativam substâncias endógenas, como aldeídos, quinonas, epóxidos e hidroperóxidos formados como metabólitos secundários durante stress oxidativo. A glutatona S-transferase encontra-se na maioria dos tecidos, como fígado, intestino, rins, cérebro e pulmões. Localiza-se no citoplasma (acima de 95%) e no retículo endoplasmático (menos de 5%) (HAYES et al., 2005).

### Glutationa Peroxidase (GPx)

A glutaciona peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e outros peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois, às custas da conversão da glutaciona (GSH) à sua forma oxidada (GSSG), conforme equação mostrada a seguir (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).



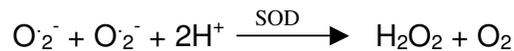
A glutaciona peroxidase contém um resíduo de selênio-cisteína em cada uma das suas quatro subunidades, o que é essencial para a atividade da enzima. Embora a GPx tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* já demonstrou ser capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana. O ciclo redox da GPx é a maior fonte de proteção contra baixos níveis de estresse oxidativo, enquanto a catalase torna-se mais significativa na proteção de níveis mais severos de estresse oxidativo. Nas células animais, especialmente em eritrócitos humanos, a GPx é considerada a principal enzima antioxidante na detoxificação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (MATÉS & SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999).

### Glutationa Redutase (GR)

Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima glutaciona redutase, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Habitualmente, a reserva intracelular de GR é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos (GILBERT & Mc LEAN, 1990). A glutaciona redutase é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses. Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GR (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

## Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase destrói o radical livre superóxido, convertendo-o em peróxido que pode ser destruído por reações mediadas pelas catalase ou pela glutathiona peroxidase. Como pode ser visto pela equação abaixo representada, a SOD converte o radical altamente reativo superóxido em um menos reativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Outra função da SOD é proteger as enzimas desidratases contra a inativação pelo radical livre superóxido.



A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Quatro classes de SOD já foram identificadas, tendo cofatores dinucleares, cobre e zinco, ou mononucleares, ferro, manganês ou níquel. A forma SOD-cobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que SOD-manganês está localizada primariamente na mitocôndria. (MATÉS & SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999).

### **2.3.3 - Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas**

A função de radicais de oxigênio e espécies reativas de oxigênio na neurodegeneração e declínio cognitivo vem sendo amplamente revista (BERR et al., 2000; SERRANO & KLANN, 2004). O aumento relacionado ao envelhecimento no dano cerebral oxidativo é melhor exemplificado por produtos da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e modificações oxidativas no núcleo e mitocôndrias. Um aumento nos níveis de proteína carbonil tem sido demonstrado em várias regiões do cérebro, incluindo o hipocampo (DROGE & SCHIPPER, 2007).

A piora na memória relacionada ao envelhecimento é correlacionada com uma diminuição de antioxidantes no cérebro e no plasma. Diversos autores sugerem a possibilidade de que o aumento no estresse oxidativo pode resultar, ao menos em parte, de uma diminuição relativa na atividade das enzimas antioxidantes. Um declínio na atividade da glutathiona peroxidase foi encontrado no hipocampo e hipotálamo de ratos idosos. Além disso, o potencial antioxidante reativo total (TRAP)

e a reatividade antioxidante total (TAR) diminuíram com a idade nos tecidos estudados, o que pode implicar na inabilidade dessas áreas em modular mudanças oxidativas, ou seja, mesmo um pequeno aumento na produção de radicais livres pode exceder a habilidade das células em se defender dessas substâncias (SIQUEIRA et al., 2005). Da mesma forma a idade provoca diminuição na atividade da superóxido dismutase e catalase, que foram notadas no cérebro, coração, fígado e rim de ratos idosos (GUPTA et al., 1991).

A concentração de glutathione intracelular (GSH), assim como a razão glutathione reduzida/glutathione oxidada (GSH/GSSG) diminui com o envelhecimento em diferentes modelos animais. Essa diminuição no nível de GSH e/ou na razão GSH/GSSH foi demonstrada em todas as regiões do cérebro de mamíferos analisadas, incluindo o hipocampo (ZHU et al., 2006). Como a cisteína é a principal precursora limitante da biossíntese de GSH intracelular, é razoável supor que o mecanismo da diminuição intracelular de GSH possa estar relacionado com a diminuição causada pelo envelhecimento na absorção da cisteína no plasma que foi demonstrada acontecer em humanos entre a terceira e a nona década de vida. Muitas células e tecidos têm alta atividade de transporte de membranas para a cisteína reduzida, mas atividade fraca ou nenhuma para o seu derivado oxidado, cistina (HACK et al., 1998).

## 2.4 - Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por disfunções progressivas e perda de neurônios e sinapses em determinadas áreas vulneráveis do sistema nervoso, determinando uma apresentação clínica e uma evolução características. As causas de doenças neurodegenerativas, em geral, são consideradas multifatoriais, ou seja, podem ocorrer devido às causas genéticas, ambientais ou endógenas, como idade. Tradicionalmente, as doenças neurodegenerativas eram definidas clínico-patologicamente, mas atualmente são classificadas de acordo com mecanismos genéticos conhecidos e/ou de acordo com os principais componentes dos seus depósitos de proteínas (JELLINGER, 2009).

Linhas convergentes de investigação têm revelado potenciais mecanismos patogênicos comuns entre diversas doenças neurodegenerativas, que incluem:

- Dinâmica anormal das proteínas, com degradação defeituosa, disfunção proteasomal e agregação;
- Estresse oxidativo e formação de radicais livres e espécies reativas do oxigênio;
- Disfunções mitocondriais e danos no DNA;
- Fragmentação do aparato neuronal de Golgi;
- Transtorno do transporte celular/axonal;
- Disfunções de neurotrofinas;
- Processos neuroinflamatórios ou neuroimunes.

Esses mecanismos são inter-relacionados em complexos círculos viciosos, que finalmente levam à disfunção e morte celulares, através de cascatas moleculares básicas que ainda estão sendo elucidadas (JELLINGER, 2009).

#### **2.4.1 - Doença de Alzheimer**

A doença de Alzheimer (AD) é uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada pela piora na memória e na cognição. É considerada a causa mais comum de demência, atingindo cerca de 5% da população acima de 65 anos de idade. O risco de um homem de 55 anos de idade tornar-se demente é de 16% e para mulheres da mesma idade, o risco chega a 33% (ALLOUL et al., 1998).

O envelhecimento e mutações genéticas são ambos fatores de risco para a AD, mas somente 5-10% dos casos da doença são causadas por mutações de formas dominantes autossômicas de genes e são caracterizadas por manifestações precoces de demência, em alguns casos em pacientes com 40 anos de idade. Os principais genes implicados na AD são os que codificam a proteína precursora da amilóide (APP, cromossomo 21), a presenilina 1 (PS-1, cromossomo 14) e a presenilina 2 (PS-2, cromossomo 1) (TSUDA et al., 1995). Polimorfismos em outros genes também foram identificados como riscos para a forma mais comum da AD de início tardio, notadamente um alelo da apolipoproteína E (APOE e4, cromossomo 19) (STRITTMATTER et al., 1993).

Fatores genéticos podem interagir com fatores ambientais para determinar a patogênese da AD. Esses fatores ambientais, que podem ser deletérios ou protetores, permanecem largamente desconhecidos (MAIA & DE MENDONÇA, 2002).

A doença de Alzheimer é caracterizada por uma piora progressiva da memória. O paciente com AD geralmente apresenta um início gradual da doença, e um progressivo e seqüencial declínio nas funções cognitivas, comportamentais e motoras. Este declínio interfere com as atividades diárias do indivíduo e, conseqüentemente, com sua qualidade de vida. Os sintomas cognitivos incluem perda de memória, piora na linguagem e desorientação de tempo, lugar e pessoas. Nos estágios iniciais, os pacientes podem apresentar sintomas de depressão. Nos estágios seguintes, sintomas comportamentais e psiquiátricos, como agitação, agressividade, ilusões e alucinações podem desenvolver-se. Finalmente, nos estágios mais avançados da doença, as funções motoras declinam e os pacientes podem tornar-se incontinentes e, por vezes, acamados (ALLOUL et al., 1998).

A injúria neuronal primária da AD ocorre em regiões do cérebro as quais envolvem o hipocampo, o sistema límbico e o córtex. A doença de Alzheimer é caracterizada pela formação de dois agregados protéicos principais: placas senis extracelulares do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) e emaranhados neurofibrilares intracelulares, que estão envolvidos no processo que leva à degeneração neuronal progressiva e morte celular.

A proteína  $\beta$ -amilóide, que constitui as placas, é composta por peptídeos de 39 a 42 aminoácidos ( $A\beta$ ), produtos da quebra da proteína precursora da amilóide (APP), que pertence a uma família de glicoproteínas transmembrana expressa em diversos tipos de células. A APP é sensível à proteólise por proteases denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  secretases. As secretases são responsáveis pela produção do peptídeo  $A\beta(1-40)$  ou  $A\beta(1-42)$ . As funções da APP permanecem pouco claras, mas várias funções vêm sendo atribuídas a ela, incluindo adesão celular, transporte de vesículas e propriedades neurotróficas e neuroprotetoras (MACCIONI et al., 2001).

Placas contendo formas agregadas de fragmentos de  $A\beta$  podem ser encontradas no córtex normal de indivíduos idosos. Sendo assim, observações de que uma significativa parcela da população idosa pode apresentar essas placas, mesmo na ausência de manifestações de qualquer forma de demência, é um argumento a favor da idéia de que a deposição de amilóide é somente um entre

diversos fatores causadores da doença, apesar de certamente contribuir para a fisiopatologia da AD (NEVE & McPHIE, 2000).

Os emaranhados neurofibrilares, compostos de pares de filamentos helicoidais, estão presentes principalmente no hipocampo, córtex entorrinal e amígdala. Esses filamentos helicoidais são estruturas anômalas geradas por agregação de formas do complexo tau hiperfosforiladas que formam uma rede compacta filamentosa. Tau são microtúbulos associados a proteínas, com funções de estabilização dos microtúbulos contra instabilidades dinâmicas e de ligação desses polímeros com outros filamentos do citoesqueleto. Em condições normais, o equilíbrio entre a fosforilação e a desfosforilação da tau modula a estabilidade do citoesqueleto e conseqüentemente a morfologia axonal. As primeiras modificações encontradas na doença de Alzheimer consistem na hiperfosforilação da tau pela ação de diferentes sistemas de proteínas quinases e fosfatases, que parecem levar a mudanças estruturais e conformacionais nessa proteína (MACCIONI et al., 2001).

Existem alguns tratamentos capazes de melhorar os sintomas cognitivos da AD. Entretanto, seria importante ter intervenções que pudessem retardar ou idealmente reverter mudanças patogênicas progressivas da AD. A propentofilina é uma xantina que foi desenvolvida para esse propósito. Apesar dos resultados preliminares terem sugerido que a propentofilina poderia atenuar a progressão da AD (KITNER et al., 1997), esses achados encorajadores não foram confirmados em testes clínicos subseqüentes. É compreensível que o uso relativamente curto de uma substância neuroprotetora dificilmente pudesse modificar a progressão de uma desordem neurodegenerativa que evolui muitos anos antes dos sintomas clínicos emergirem, como parece ser o caso da AD. Interessantemente, outra xantina, a cafeína, é a substância psicoativa mais consumida no mundo e, na maioria das vezes, esse consumo é feito regularmente e durante toda a vida, o que leva à hipótese da cafeína poder exercer uma função neuroprotetora em longo prazo, retardando ou evitando o aparecimento da doença de Alzheimer.

#### **2.4.2 - Doença de Alzheimer e estresse oxidativo**

O estresse oxidativo possui um importante papel no início e na progressão da doença de Alzheimer. Os produtos oxidativos de lipídeos, proteínas e DNA foram

reportados em pacientes com AD. No neocórtex do cérebro de indivíduos com AD, o produto final da peroxidação lipídica, o malonaldeído (MDA), foi encontrado em quantidades significativamente maiores do que em idosos utilizados como controle (PALMER & BURNS, 1994). Níveis de outro produto da peroxidação lipídica, o 4-hidroxinonenal (4-HNE) também está aumentado no plasma de pacientes com AD. O 4-HNE é um aldeído resultante da peroxidação lipídica que pode levar à ativação da caspase e à apoptose. Além disso, 4-HNE pode se conjugar com os transportadores de glicose neuronal, e como consequência, piorar a atividade de transporte de glicose celular na AD (MCGRAT et al., 2001). Perda de proteínas específicas do plasma, como a apolipoproteína E (apoE), também pode ter um papel na indução de injúria durante o estresse oxidativo na AD. Em estudos que examinaram sinaptossomas corticais ou neurônios de camundongos sem apoE, as amostras dos camundongos knockouts de apoE possuíam níveis elevados de estresse oxidativo e atividade da caspase durante a exposição à proteína A $\beta$ , assim como aumento da atividade da óxido nítrico sintetase, sugerindo, assim, um papel protetor para a apolipoproteína E (KELLER et al., 2000).

Outras evidências sugerem que a injúria celular durante a AD pode resultar tanto da produção de ROS como de uma piora nos mecanismos de reparo celular após o estresse oxidativo. LOVEL et al. (1999) quantificaram 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), um marcador de dano oxidativo, no fluido cerebrospinal de pacientes com AD. Os autores observaram que pacientes com AD apresentavam níveis elevados de 8-OHdG ligadas ao DNA intacto, o que sugere que esses pacientes têm um prejuízo nos mecanismos de reparação do DNA. Além disso, níveis de 8-OHdG livres, que são gerados durante mecanismos de reparo celulares normais, estavam significativamente diminuídos nos pacientes com AD, confirmando a premissa de mecanismos de reparo de DNA deficientes nesses pacientes.

RINALDI et al. (2003) demonstraram que um maior nível de estresse oxidativo na AD pode também ser o resultado de uma diminuição nos níveis e na atividade de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos no plasma. Pacientes com AD mostraram depleção nos níveis de vitamina A, vitamina C e vitamina E, além de menor atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Por outro lado, diversos estudos têm demonstrado que a suplementação da dieta com diferentes fontes de antioxidantes atenuam a perda cognitiva em animais. CHEN et al. (2009) mostraram que polifenóis, presentes no chá verde, atenuam disfunções

cognitivas induzidas pelo estresse fisiológico. Houve melhora da performance dos animais em diferentes tarefas comportamentais. Já o ácido ascórbico demonstrou atenuar déficits de aprendizado espacial induzidos pela escopolamina no teste do water maze (HARRISON et al., 2009). Sendo assim, uma dieta rica em antioxidantes poderia prevenir ou retardar a deterioração cognitiva na AD.

A neurotoxicidade da proteína A $\beta$ -amilóide, a maior componente da patogênese da AD, também é associada com injúria celular seguida de exposição às ROS. Em camundongos cuja expressão de APP está aumentada, os depósitos de A $\beta$ , que são caracteristicamente encontradas na AD, se co-localizam com diversos marcadores de estresse oxidativo (SMITH et al., 1998), sugerindo que existe uma correlação estreita entre o estresse oxidativo e o depósito de A $\beta$ . Além disso, agentes que modulam as ROS, como a vitamina E, reduziram a neurotoxicidade durante a exposição à A $\beta$  (SUBRAMANIAM et al., 1998).

Durante as últimas décadas, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de comprovar que a A $\beta$  pode levar diretamente à geração de ROS. BEHL et al. (1994) demonstraram que A $\beta$  pode levar à geração de peróxido de hidrogênio e à morte celular em cultura primária de neurônios. A habilidade da A $\beta$  em gerar ROS pode ser o resultado da sua composição com metionina, já que a substituição da metionina pela valina ou a remoção da metionina da proteína A $\beta$ , bloqueia a produção de ROS, a oxidação de proteínas e a toxicidade em neurônios hipocâmpais (VARADARAJAN et al., 1999). Além disso, a geração de radicais livres pela proteína A $\beta$  parece ser fortemente influenciada pelo estado de agregação dos peptídeos, já que a inibição da agregação da A $\beta$  leva à redução da toxicidade neuronal e à geração de radicais livres (MONJI et al., 2001).

A formação de canais durante o estresse oxidativo também pode ser um fator significativo na patogênese da AD e na toxicidade da A $\beta$ . A proteína A $\beta$ -amilóide é capaz de espontaneamente inserir-se nas membranas lipídicas e formar canais seletivos, voltagem-dependentes e permeáveis a íons. Os canais formados podem ser permeáveis ao cálcio e levar à toxicidade celular através da perda da homeostase do cálcio. Além disso, os agregados de A $\beta$  podem interagir com a bicamada lipídica e reduzir a fluidez da membrana, potencialmente piorando a função celular e promovendo uma injúria celular (KREMER et al., 2001).

### **2.4.3 - Indução de diabetes por estreptozotocina como modelo para a doença de Alzheimer**

O diabetes é caracterizado por uma hiperglicemia que resulta de uma deficiência absoluta ou relativa de insulina e é associada com complicações de longo prazo que afetam os olhos, rins, coração e nervos. O diabetes causa uma variedade de distúrbios funcionais e estruturais no sistema nervoso central e periférico (BIESSELS et al., 1994). Além disso, existem anormalidades eletrofisiológicas e estruturais no cérebro de pacientes diabéticos que fornecem boas razões para se acreditar que as funções cognitivas são afetadas, o que pode estar associado com uma atrofia da formação hipocampal, que é envolvida nos processos de aprendizagem e memória (BRANDS et al., 2005). Uma piora moderada do aprendizado e memória tem sido observada em adultos com diabetes (TUN et al., 1990).

O modelo frequentemente usado de diabetes tipo 1, os ratos diabéticos induzidos por dose única de estreptozotocina (STZ), é caracterizado por hiperglicemia crônica associada com piora no aprendizado e na memória hipocampal, assim como plasticidade sináptica defeituosa no hipocampo (BIESSELS et al., 1996). Além disso, LIU e colaboradores (2008) demonstraram que a indução de diabetes por dose única de STZ (65 mg/kg) induziu um aumento significativo nos níveis da proteína  $\beta$ -amilóide em tecidos cerebrais de ratos, resultando, respectivamente, em um aumento na concentração da  $A\beta$  de 4,2 e 3,9 vezes no córtex e hipocampo dos animais, quando comparados com ratos não diabéticos.

A doença de Alzheimer é caracterizada por uma piora progressiva da memória e pela formação de placas senis extracelulares do peptídeo  $A\beta$ -amilóide no cérebro. Sendo assim, como ratos diabéticos induzidos por STZ também apresentam estes sinais com o desenvolvimento do diabetes, estes podem ser utilizados como um modelo para se estudar essas características da doença de Alzheimer, bem como avaliar a efetividade de compostos que possam prevenir ou retardar o aparecimento desses sinais da doença de Alzheimer.

## 2.5 - Café e aprendizado e memória

A adenosina endógena, pela ativação de receptores A<sub>1</sub>, modula o fenômeno de plasticidade sináptica de longo prazo, assim como a potenciação e a depressão de longo prazo. De acordo com a noção de que a plasticidade sináptica é a base do aprendizado e da memória em diferentes áreas do cérebro, a adenosina de maneira correspondente modula o comportamento em vários paradigmas de aprendizagem e memória. Os efeitos cognitivos da cafeína são na maioria devidos a sua habilidade em antagonizar receptores de adenosina no hipocampo e córtex, que são as áreas do cérebro mais envolvidas na cognição (DE MENDONÇA & RIBEIRO, 2001).

Normalmente se acredita que a cafeína e outras xantinas relacionadas melhoram o aprendizado e a memória. Por outro lado, uma revisão de estudos nessa área mostra que há controvérsias no assunto. Enquanto muitos estudos sugerem um efeito protetor da cafeína na aprendizagem e memória em animais e humanos (RIEDEL et al., 1995; CESTARI & CASTELLANO, 1996) outros estudos reportam que a cafeína não afeta a memória ou mesmo piora (SMITH et al., 1994; FISHER & GUILLET, 1997).

Uma possível razão para essa controvérsia pode ser que a cafeína não apresenta um efeito benéfico geral em todos os tipos de memória e que esse efeito pode não ser o mesmo em todas as fases do processo de memória. Apesar do grande número de estudos na literatura sobre o efeito da cafeína na memória, nenhum deles apresenta um estudo sistemático dos efeitos da cafeína na memória, considerando o estágio específico de armazenamento da memória que é afetado e as especificidades de cada teste de memória. Além disso, em algumas dessas investigações, os efeitos da cafeína na memória não são o objetivo principal do estudo, mas uma observação feita em paralelo com outros itens (ANGELUCCI et al., 1999).

Recentemente, a administração de cafeína preveniu os déficits cognitivos e a neurodegeneração em modelos de desordens neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson (ARENDASH et al., 2006; DALL'IGNA et al., 2003; GEVAERD et al., 2001). Além disso, dois estudos epidemiológicos sugeriram que o consumo de cafeína previne a piora cognitiva. O primeiro estudo foi feito de maneira retrospectiva e o consumo de cafeína foi associado com um menor risco de

desenvolvimento de demência relacionada à doença de Alzheimer (MAIA & MENDONÇA, 2002). No segundo estudo, os efeitos preventivos do consumo de cafeína foram confirmados num estudo prospectivo em mulheres idosas, onde o consumo de cafeína foi monitorado por 4 anos (RITCHIE et al., 2007).

O café e a cafeína afetam as vias comportamentais e bioquímicas que influenciam a neurogênese no hipocampo de adultos. Em doses moderadas, a cafeína aumenta a atividade locomotora, o que parece aumentar a neurogênese no giro dentato (VAN PRAAG et al., 1999). A cafeína em altas doses também pode contribuir para a privação de sono, ansiedade ou estresse, o que tem sido associado com a depressão da neurogênese adulta (GUZMAN-MARIN et al., 2005). Indiretamente, os efeitos vasoconstritores da cafeína podem alterar o nível vascular neurogênico e modificar a neurogênese adulta (PALMER et al., 2000). Estudos recentes de WENTZ & MAGAVI (2009) mostraram que baixas doses de cafeína, 10 mg/kg por dia, não tiveram efeito na proliferação neuronal. Doses moderadas, entre 20 e 25 mg/kg/dia, diminuíram a proliferação no giro dentato entre 20 e 25%, enquanto altas doses, de 60 mg/kg/dia, aumentaram a proliferação em mais de 50%.

O piroglutamato (PGA), também conhecido como ácido 2-oxo-pirrolidona carboxílico ou PCA, é um intermediário do ciclo do gamaglutamyl na síntese e degradação da glutatona. Durante o processamento do café, o l-glutamato pode espontaneamente ser convertido em piroglutamato. O PGA foi detectado no café liofilizado em uma concentração cerca de 10 vezes maior do que no café em grão, e provavelmente esse fato está relacionado a algum estágio do processo industrial do preparo do café instantâneo (MAESO et al., 2006). Diversos estudos demonstraram que o PGA apresenta efeitos na melhora cognitiva em animais, que poderiam ser atribuídas a um aumento da liberação de acetilcolina no córtex cerebral (ANTONELLI et al., 1984), proteção contra a neurotoxicidade induzida pelo glutamato ou melhora da perfusão cerebral (XIAO et al., 1999). Além disso, em um estudo duplo-cego com adultos idosos, a memória verbal apresentou uma melhora quando comparada ao placebo (GRIOLI et al., 1990). Esses antecedentes levam a possibilidade de o conteúdo de piroglutamato presente no café também contribuir para alguns efeitos centrais da bebida, como redução da fadiga, melhora da atenção e aumento da cognição.

## 2.6 - Café e estresse oxidativo

Os polifenóis têm demonstrado exercer uma variedade de ações biológicas, como seqüestro de radicais livres, quelação de metais e modulação da atividade enzimática. Estudos epidemiológicos têm sugerido a associação do consumo de alimentos ricos em polifenóis e a prevenção de algumas doenças humanas (NARDINI et al., 2002). O café contém diversos componentes fenólicos que são associados à capacidade antioxidante da bebida, sendo que o conteúdo total de polifenóis varia entre 200-550 mg por xícara. Entre os principais componentes fenólicos identificados no café estão os ácidos clorogênicos, que podem estar presentes entre 70 a 325 mg por xícara (200 ml) (NATELLA et al., 2002). Diversos estudos já demonstraram os efeitos protetores do ácido clorogênico contra o estresse oxidativo. Em um estudo *in vitro*, esse composto demonstrou atenuar a morte de células neuronais induzidas por peróxido de hidrogênio, inibindo significativamente a condensação nuclear e a fragmentação do DNA induzidas pelo  $H_2O_2$ . Além disso, o pré-tratamento com ácido clorogênico inibiu a quebra da caspase 3, que é uma protease que medeia a morte celular e é quebrada e ativada durante a apoptose (CHO et al., 2009). Outros polifenóis presentes no café também já tiveram seus efeitos protetores estudados, como o ácido caféico, que demonstrou inibir de maneira dose-dependente a metilação do DNA *in vitro* e também a metilação de uma região promotora de um gene representativo de linhagens celulares cancerosas humanas (LEE & ZHU, 2006).

A cafeína e seus metabólitos têm demonstrado apresentar efeitos antioxidantes, e essas propriedades podem estar relacionadas com suas ações neuroprotetoras. Em estudos *in vitro*, SHI et al. (1991) investigaram, utilizando a ressonância de spin de elétron (ESR), que a cafeína eficientemente seqüestra radicais hidroxil em uma taxa constante e comparável com outros eficientes antioxidantes. Já em um estudo baseado na capacidade de a cafeína absorver radical de oxigênio e de inibir a peroxidação do LDL, LEE (2000) não observou atividade antioxidante ou habilidade protetora presente na cafeína, mas sim nos seus principais metabólitos nos humanos, a 1-metilxantina e o ácido 1-metilúrico.

Estudos com administração de cafeína em animais experimentais também têm sugerido seu potencial em aumentar a atividade de enzimas antioxidantes. NOSCHANG et al. (2009), utilizando doses de 0,3 e 0,1 g/L de cafeína na bebida dos

animais, durante 40 dias, observaram um aumento na atividade da superóxido dismutase e da catalase no córtex cerebral. De maneira interessante, esse aumento na atividade dessas enzimas não foi observado quando a cafeína foi administrada aos animais submetidos a um estresse crônico.

Outros dois importantes componentes do café, os diterpenos caveol e cafestol, também já demonstraram possuir efeitos protetores contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio e consequente dano no DNA. Em experimentos de citotoxicidade e peroxidação lipídica, o caveol e o cafestol protegeram efetivamente culturas celulares da injúria causada pelo peróxido de hidrogênio, aumentando a viabilidade celular e diminuindo a formação de TBARS. Além disso, células enriquecidas com caveol e cafestol também mostraram serem resistentes ao hidroperóxido tert-butil, devido ao sequestro dos radicais peroxil e a prevenção da peroxidação lipídica por esses compostos (LEE & JEONG, 2007).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 – Objetivo geral

Investigar o efeito do café, como alimento funcional, sobre a modulação do sistema antioxidante endógeno no sistema nervoso central de ratos e na performance cognitiva de animais adultos.

#### 3.2 – Objetivos específicos

1. Avaliar o consumo dos diferentes tipos de ração controle, com café e com cafeína pelos animais experimentais;
2. Avaliar o ganho de peso dos animais alimentados com dieta composta de ração de rato enriquecida com ração para cães e com café e cafeína;
3. Avaliar o efeito da suplementação da dieta com café ou cafeína sobre a atividade exploratória e locomotora dos animais;
4. Verificar o efeito do consumo crônico de café e cafeína no aprendizado e memória dos animais, por teste comportamental de memória de reconhecimento de objetos;
5. Investigar o efeito da ingestão de café ou cafeína sobre o índice de peroxidação de lipídeos em tecido cerebral de ratos;
6. Determinar o efeito da ingestão de café e cafeína no teor de glutathione reduzida (GSH) e na atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST) em tecido cerebral de ratos;
7. Investigar o efeito da ingestão de café e cafeína na atividade das enzimas antioxidantes glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) em tecido cerebral de ratos;
8. Investigar o efeito da ingestão diária de café e cafeína nos níveis da proteína A $\beta$ -amilóide (1-40) no córtex e no hipocampo de ratos controle e com diabetes induzida por estreptozotocina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 – Protocolo Experimental

O protocolo experimental está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal conforme projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) sob o protocolo nº 126/2007.

#### 4.1.1 – Animais

##### 4.1.1.1 – Bloco A

Ratos da raça Wistar da colônia do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG foram acasalados. Durante o período de gestação e amamentação as fêmeas receberam dieta composta de ração para ratos (Labina®, Purina, MG, Brasil) enriquecida com 20% de ração para cães (Bonzo Mix Carnes®, Purina, SP, Brasil). Após o parto, o número de filhotes por fêmea foi fixado em oito, sendo que posteriormente somente os machos foram mantidos. Após o desmame (aos 21 dias de vida), os filhotes foram alocados em gaiolas individuais, sendo separados aleatoriamente em cinco grupos experimentais:

**Grupo controle (GC):** alimentado com dieta controle, composta de ração para ratos enriquecida com ração para cães.

**Grupo Café 3% (G3%):** alimentado com dieta controle suplementada com extrato de café (3%).

**Grupo Café 6% (G6%):** alimentado com dieta controle suplementada com extrato de café (6%).

**Grupo Cafeína 0,04% (G0,04%):** alimentado com dieta controle suplementada com 0,04% de cafeína anidra.

**Grupo Cafeína 0,08% (G0,08%):** alimentado com dieta controle suplementada com 0,08% de cafeína anidra.

Todos os grupos receberam água *ad libitum* e foram pesados em intervalos de 10 dias. A ingestão da dieta controle e experimental foi medida diariamente.

Aos 90 dias de vida, os animais foram submetidos a dois testes comportamentais: campo aberto e memória de reconhecimento de objetos (preferência por novo objeto).

Por volta dos 100 dias de vida, os ratos foram sacrificados por decapitação. O cérebro foi processado para posterior análise das medidas bioquímicas de estresse oxidativo.

#### 4.1.1.2 – Bloco B

Ratos da raça Wistar da colônia do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG foram acasalados. Durante o período de gestação e amamentação as fêmeas receberam dieta composta de ração para ratos (Labina®, Purina, MG, Brasil) enriquecida com 20% de ração para cães (Bonzo Mix Carnes®, Purina, SP, Brasil). Após o parto, o número de filhotes por fêmea foi fixado em oito, sendo que posteriormente somente os machos foram mantidos. Após o desmame (aos 21 dias de vida), os filhotes foram alocados em gaiolas individuais, sendo separados aleatoriamente em três grupos experimentais:

**Grupo controle (GC):** alimentado com dieta controle, composta de ração para ratos enriquecida com ração para cães.

**Grupo Café 6% (GCafé%):** alimentado com dieta controle suplementada com extrato de café (6%).

**Grupo Cafeína 0,08% (GCfeína%):** alimentado com dieta controle suplementada com 0,08% de cafeína anidra.

Todos os grupos receberam água *ad libitum* e foram pesados em intervalos de 10 dias. A ingestão da dieta controle e experimental foi medida diariamente.

Aos 60 dias de vida, metade dos animais de cada grupo foi submetida a um tratamento para indução de diabetes, de acordo com LIU et al (2008). Após 12 horas de jejum, os animais receberam dose única de injeção de estreptozotocina 65 mg/kg, intraperitonealmente, dissolvida em tampão citrato de sódio 100 mM, pH 4,5. O

desenvolvimento da diabetes foi confirmado pela medida da glicose sanguínea sem jejum, usando kit reagente (StatStrip glico sensor xpress, Nova Biomedical, Waltham, MA, EUA). Ratos com nível de glicose maior que 250 mg/dL (14,0 mM), após uma semana da injeção de estreptozotocina, foram considerados diabéticos e incluídos no experimento. A outra metade dos animais de cada grupo recebeu injeção de tampão citrato de sódio somente (controle), e também teve a medida de glicose sanguínea monitorada.

Os animais foram sacrificados aos 90 dias de vida, por decapitação. A glicose sanguínea foi previamente medida para confirmação do desenvolvimento ou não da diabetes. O cérebro foi processado para posterior análise da proteína A $\beta$ -amilóide.

## 4.2 – Material

### 4.2.1 – Equipamentos

Espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 (Hitachinaka, Japão). Espectrofluorofotômetro Shimadzu RF-5301 PC (Kyoto, Japão). Centrífuga refrigerada Hitachi modelo CR21 (Hitachinaka, Japão). Banho com agitação e temperatura regulável Yamato Scientific Co, modelo BT-25 (Tokyo, Japão). Banho Maria Metabólico Dubnoff, modelo TE053 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Micro-moinho tipo Willye Tecnal, modelo Te-648 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Estufa de esterilização e secagem com circulação de ar forçada e termômetro digital Nova Ética, modelo 420D (Vargem Grande Paulista, SP, Brasil). Leitor de ELISA Versamax Molecular Devices.

### 4.2.2 – Reagentes químicos

1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB); ortoftaldeído (OPT); nicotinamida adenina di-nucleotídeo fosfato, forma reduzida (NADPH); glutationa na forma reduzida 98% (GSH); glutationa na forma oxidada (GSSG); glutationa redutase; ácido tiobarbitúrico

(TBA); estreptozotocina e albumina de soro bovino foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA).

Ácido pirogálico (pirogalol) e cafeína anidra foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil).

Kit de ELISA colorimétrico para A $\beta$ -amilóide 1-40 foi adquirido da Invitrogen Co (Carlsbad, CA, EUA).

Todos os outros reagentes utilizados apresentaram o mais alto grau de pureza comercialmente disponível.

#### **4.2.3 – Caracterização do café**

O café utilizado foi da espécie *Coffea arabica*, torrado a uma temperatura de 160°C em tempo aproximado de 13 minutos na classificação 45 ideal para consumo. A classificação dos pontos de torra foi realizada com auxílio de discos colorimétricos AGTRON/SCAA, de acordo com os padrões utilizados pela Associação Brasileira da Indústria de Café. A amostra utilizada foi do tipo exportação, grão sem defeito, granulação média e de processo de preparo natural de bebida mole.

O teor de cafeína presente no pó de café foi de 12,5 mg cafeína/g de café (1,25%).

### **4.3 – Métodos**

#### **4.3.1 – Extração do café**

A extração do café foi realizada de acordo com VITORINO et al. (2001) com algumas modificações. Um volume de 100 mL de água destilada foi aquecido em chapa elétrica até 90°C e vertido lentamente sobre 3 g (café 3%) ou 6 g (café 6%) da amostra do café moído. Após agitação por 2 minutos, a suspensão foi resfriada em banho à temperatura ambiente por 10 minutos. O extrato foi então centrifugado

(Centrifuga Hitachi, Hitachinaka, Japão) a 27 g por 10 min a 10°C. O sobrenadante foi coletado em uma proveta e o volume completado para 100 mL.

#### **4.3.2 - Preparo das dietas**

O preparo da dieta foi realizado por adaptação da técnica utilizada por PAOLINELLI (2002). As rações Labina® (Purina, SP, Brasil) e Bonzo® (Purina, SP, Brasil) foram previamente moídas em micro-moinho (Tecnal, SP, Brasil) e misturadas numa proporção de 4:1, respectivamente. A cada 90 g desta mistura foram adicionadas 100 mL de uma solução contendo 4% de gelatina em pó, 1% de amido de milho e 5% de açúcar, previamente dissolvidos a quente, recebendo o nome de dieta controle. A dieta suplementada com café teve a dieta controle como base, porém 100 mL do extrato de café a 3% ou 6% foram utilizados para o preparo da solução contendo gelatina, amido e açúcar. Do mesmo modo, a dieta suplementada com cafeína, teve a dieta controle como base, porém a esta foi adicionada 0,04% ou 0,08% de cafeína (valores correspondentes ao teor de cafeína presente na dieta com café a 3% e 6%, respectivamente). Depois de adequadamente homogeneizada, a massa resultante foi cortada em pequenos pedaços e secada a 60 °C em estufa de esterilização e secagem com circulação de ar forçada (NOVA ÉTICA, modelo 420D, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil).

#### **4.3.3 – Testes comportamentais**

Os testes comportamentais foram realizados em uma caixa de acrílico aberta na parte superior, de dimensões de 50 x 50 x 40 cm. As paredes laterais da caixa foram cobertas com cartolina preta para que nenhum estímulo externo interferisse nos testes. Na parte inferior da caixa (assoalho) foi colocada uma cartolina dividida em 16 quadrados de iguais dimensões.

Os animais foram ambientados na sala de experimento por, aproximadamente, 60 minutos. Os testes foram realizados sempre no período da tarde (13:00 – 18:00 h).

Os objetos apresentados aos animais como estímulo eram feitos de peças plásticas de encaixar (Gulliver, SP, Brasil) e variavam em forma, cor e tamanho; e foram fixados ao chão da caixa para não se moverem durante os testes.

A caixa e os objetos utilizados nos testes eram limpos com álcool 70% entre um animal e outro, para retirar qualquer interferência olfatória.

Foi realizada uma habituação dos animais à caixa de acrílico onde seriam realizados os testes: eles foram colocados no interior da caixa, sem qualquer estímulo, por três dias consecutivos durante 20 minutos.

#### 4.3.3.1 – Campo aberto (Open field)

O teste de campo aberto foi realizado para se analisar a atividade exploratória e locomotora dos animais, bem como a memória não-associativa de habituação (adaptado por PEREIRA et al., 2005).

Cada animal foi colocado no quadrante esquerdo superior da caixa de acrílico e durante cinco minutos foram contados os seguintes parâmetros:

- Crossing: número de vezes que o animal mudou de quadrado
- Rearing: número de vezes que o animal se levantou nas patas traseiras.

As medidas foram realizadas em dois dias consecutivos. Os dados de crossing e rearing do primeiro dia foram utilizados como parâmetros de atividades locomotora e exploratória. Já os dados de crossing e rearing do segundo dia de teste foram comparados com os dados do primeiro dia e utilizados para avaliar a retenção da memória não-associativa de habituação.

#### 4.3.3.2 – Memória de reconhecimento de objetos – preferência por objeto novo

Neste teste, a preferência do animal por um novo objeto foi avaliada (ENNACEUR & DELACOUR, 1988). O procedimento compreendeu uma fase de treino, seguida por duas fases de teste, a primeira de 90 minutos pós-treino (memória de curta duração) e outra 24 horas pós-treino (memória de longa duração).

Na fase do treino, cópias duplicadas (A1 e A2) de um objeto foram colocadas próximo a dois cantos da caixa (esquerda inferior e direita superior) a 15 cm de cada parede. O animal foi então colocado no canto direito inferior da caixa e permitido explorar os objetos por 5 minutos. O tempo de exploração do animal em cada objeto foi cronometrado. Após 90 minutos (memória de curto prazo) foi realizada a primeira fase do teste. O animal foi recolocado na caixa, com dois objetos na mesma posição: uma cópia do objeto utilizado na fase treino (A3) e um novo objeto (B). O tempo de exploração de cada objeto foi cronometrado por 5 minutos. A segunda fase de teste foi realizada após 24 horas (memória de longo prazo), com uma cópia do objeto utilizado na fase treino (A4) e um novo objeto (C).

As posições dos objetos na fase treino e teste e os objetos usados como novo ou familiar foram contrabalanceados entre os animais.

O comportamento exploratório foi definido pelo direcionamento e movimentação das vibrissas do animal para o objeto. Qualquer outro comportamento, por exemplo, olhar ao redor ou descansar contra (em frente ao) o objeto, não foi considerado exploração.

Os resultados do tempo de exploração dos objetos foram expressos como índice de discriminação que foi calculado segundo a fórmula: tempo de exploração do objeto novo/ tempo total de exploração.

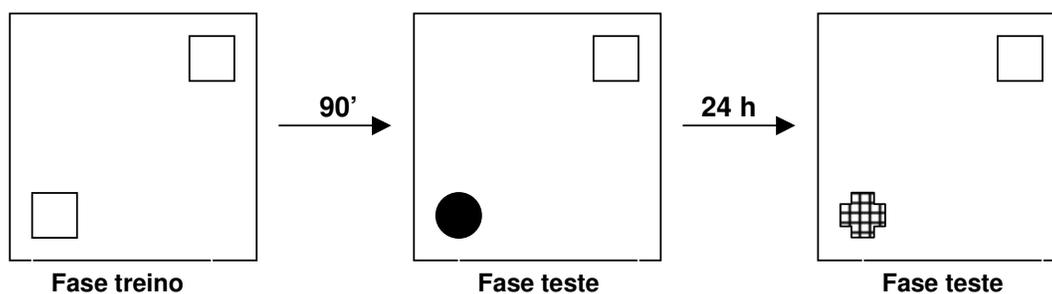


Figura 2 - Diagrama representativo do teste de memória de reconhecimento de objetos – preferência por objeto novo

#### **4.3.4 – Medidas bioquímicas**

##### 4.3.4.1 - Preparo do homogeneizado de cérebro

Após retirar o cerebelo, o cérebro foi pesado e homogeneizado em 10 volumes (1:10 p/v) de tampão fosfato de sódio 50 mM, acrescido de KCl 140 mM, pH 7,4. Foi realizada, então, uma centrifugação a 750 x g, por 10 minutos a 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante guardado em eppendorfs de um mL. Todas as amostras foram guardadas em freezer -70°C até a realização dos testes.

##### 4.3.4.2 - Peroxidação de lipídeos

A peroxidação lipídica foi analisada de acordo com o método proposto por YAGIK (1984), com modificações. Trezentos microlitros de ácido tricloroacético 10% gelado foram adicionados a 150 µL da amostra. Foi realizada, então, uma centrifugação a 300 g por 10 minutos. Em seguida, 300 µL do sobrenadante foram incubados em água fervente por 25 minutos com 300 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% em sulfato de sódio 7,1%. Após resfriamento foi feita a leitura no espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão) a 532 nm, que foi convertida em nmol de malonaldeído, utilizando-se o coeficiente de absorção molar (YAGIK, 1984).

##### 4.3.4.3 - Avaliação da glutathiona

O conteúdo de GSH foi medido segundo o método de TIETZE (1969). Em 100 µL da amostra foram adicionados 1,8 mL de tampão fosfato-EDTA pH 8,0 e 100 µL de solução de OPT (ortoftaldeído), obtendo-se assim, uma solução final de 2,0 mL. Esta solução foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos e logo após realizou-se a leitura em espectrofluorofotômetro (Shimadzu RF-5301 PC, Kyoto, Japão) utilizando o comprimento de onda de 350 nm de excitação e 420 nm de

emissão. Foi preparada uma curva padrão com concentrações de GSH entre 0,01 – 1 mM.

#### 4.3.4.4 – Atividade da glutatona-S-transferase

A atividade da glutatona-S-transferase (GST) foi realizada segundo o método de HABIG et al. (1974). O procedimento consistiu na adição de 805 µL de tampão fosfato 0,1 M + EDTA 1,0 mM em pH 6,5; 15 µL de GSH 60 mM; 30 µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 30 mM; 50 µL da amostra, num volume final de 0,9 mL. Os reagentes foram colocados diretamente nas cubetas e a leitura feita em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão) a 345 nm.

#### 4.3.4.5 – Atividade da glutatona peroxidase

Atividade da glutatona peroxidase foi medida de acordo com PAGLIA & VALENTINE (1967). Foram misturados 580 µL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0), contendo 5 mM de EDTA; 100 µL NADPH 8,4 mM; 10 µL glutatona redutase (100 UI/mg proteína/ml); 10 µL NaN<sub>3</sub> 1,125 M; 100 µL de glutatona reduzida 0,15 M e 100 µL da amostra. A reação enzimática iniciou-se pela adição de 250 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,2 mM. A conversão do NADPH em NADP foi medida pela absorbância do sistema em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão) a 340 nm por 4 minutos após o início da reação. A unidade enzimática foi definida como a oxidação de 1 µmol de NADPH por minuto por mg de proteína e foi calculado com base na absorvidade molar do NADPH (PAGLIA & VALENTINE, 1967) a 340 nm.

#### 4.3.4.6 – Atividade da glutatona redutase

Avaliação da atividade da glutatona redutase foi realizada segundo CARLBERG & MANNERVIK (1975). Em um volume de 1,0 mL, 810 µL de tampão fosfato de potássio 0,10 M + 0,5 M EDTA (pH 7,6); 30 µL de NADPH 2,0 mM; 60 µL

de glutationa oxidada 2,0 mM e 100 µL da amostra foram misturados. A medida foi feita, em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão), a 340 nm em intervalos de 30 segundos. A unidade enzimática foi definida como a oxidação de 1 µmol de NADPH por minuto por mg de proteína e foi calculado com base na absorvidade molar do NADPH (PAGLIA & VALENTINE, 1967) a 340 nm.

#### 4.3.4.7 – Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi medida de acordo com MARKLUND & MARKLUND (1974) e se baseou na inibição da auto-oxidação do pirogalol. Em resumo, 780 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4), 20 µL de EDTA 50 mM e 100 µL da amostra foram adicionados a 100 µL de pirogalol 2 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 420 nm (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão) durante cinco minutos. O resultado foi expresso como U/mg proteína, sendo U igual à quantidade de enzima que inibe 50% da auto-oxidação do pirogalol.

#### 4.3.4.8 - Determinação de proteína

O teor de proteína foi determinado pelo método de LOWRY et al. (1951), modificado por HARTREE (1972), utilizando a albumina de soro bovino como padrão. Exatamente 0,1 mL da amostra foi adicionado a 2,0 mL de NaOH 1N. Após incubar em banho aquecido (50°C) por 1 hora e esfriar completamente, 150 µL desta solução foram aliqüotadas em tubos de vidro em duplicata, e o volume completado com água destilada para um volume final de 1,0 mL. Foi adicionado a cada tubo um volume de 0,9 mL da solução A (2,0 g de tartarato de sódio e potássio; 100,0 g de carbonato de sódio e 500 mL de solução de NaOH 1 N) e aqueceram-se os tubos em banho-maria a 50 °C por 10 minutos. Após resfriamento, adicionou-se um volume de 0,1 mL da solução B (2,0 g de tartarato de sódio e potássio; 1,0 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O e 10 mL de NaOH 1 N), seguindo-se de homogeneização. Após repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 3,0 mL da solução C (1 volume de reativo de Folin-Ciocalteu para

cada 15 volumes de água destilada), seguido de agitação. Logo após, incubou-se em banho a 50 °C por mais 10 minutos. Após resfriamento, foi efetuada a leitura das amostras em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2001, Hitachinaka City, Japão) a 650 nm.

#### 4.3.4.9 – Determinação de DNA

A determinação do DNA foi de acordo com o método de PRASAD et al. (1972), que se baseia na medida da fluorescência desenvolvida pelo brometo de etídio ao interagir com os ácidos nucléicos.

A uma alíquota de 0,2 mL da amostra foi acrescentada 1,8 mL de tampão Tris-NaCl (pH 7,5-8,5) e 2,0 mL de solução de brometo de etídio (20 µg/mL). Um volume de 30,0 µL de ribonuclease (2,0 µg/mL) foi adicionado para hidrólise de RNAs. Após agitação, as amostras foram incubadas em banho a 50°C por uma hora. A fluorescência resultante foi lida em espectrofluorofotômetro (Shimadzu RF-5301 PC, Kyoto, Japão), com comprimento de onda 315/590 excitação/emissão, utilizando DNA de salmão (Sigma) como padrão. Os resultados foram expressos em miligramas de DNA por g de tecido.

### **4.3.5 – Medidas bioquímicas nos animais com diabetes induzida por STZ**

#### 4.3.5.1 – Medida da glicose sanguínea

A medida da glicose sanguínea dos animais foi realizada sem jejum, usando kit reagente (StatStrip glico sensor xpress, Nova Biomedical, Waltham, MA, EUA).

#### 4.3.5.2 - Preparo do homogeneizado de cérebro

O hipocampo e o córtex do cérebro de cada animal foram dissecados, pesados e homogeneizados separadamente em 10 volumes (1:10 p/v) de cloridrato de guanidina 5M e Tris HCl 50 mM, pH 8,0. Os homogeneizados foram misturados durante 3 - 4 horas à temperatura ambiente, e então, estocados a -20° C até a quantificação da proteína A $\beta$ -amilóide (LIU et al., 2008).

#### 4.3.5.3 – Medida da concentração de A $\beta$ -amilóide (1-40)

As amostras foram centrifugadas a 16.000 x g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado para a medida da proteína A $\beta$ -amilóide, utilizando-se o kit de ELISA colorimétrico para A $\beta$ -amilóide 1-40 da Invitrogen Co (Carlsbad, CA, EUA).

A técnica consistiu na adição de 50  $\mu$ L dos padrões (curva padrão) e amostras nos poços da placa de ELISA revestida com um anticorpo monoclonal específico para o terminal NH<sub>2</sub> da proteína A $\beta$ -amilóide. Em seguida, 50  $\mu$ L de um anticorpo de coelho específico para o terminal COOH da seqüência da proteína foram adicionados aos poços da placa, que foi então incubada por 3 horas à temperatura ambiente. Após lavagem da placa por quatro vezes com tampão de lavagem apropriado, 100  $\mu$ L de um anticorpo anticoelho foi adicionado aos poços e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a retirada do excesso do anticorpo com a lavagem da placa por quatro vezes, 100  $\mu$ L de um substrato cromógeno foi adicionado aos poços, produzindo cor. A intensidade do produto colorido obtido em cada poço foi diretamente proporcional à concentração da proteína A $\beta$ -amilóide presente nas amostras. Após incubação da placa por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro, foi adicionado aos poços 100  $\mu$ L de uma solução “stop” que finalizou a reação. A absorbância de cada poço foi então lida a 450 nm, utilizando-se um leitor de Elisa.

#### 4.4 - Análise estatística dos dados

Os resultados do teste de campo aberto foram analisados por Anova e a discriminação das médias pelo teste de Duncan. Já os resultados do teste de memória de reconhecimento de objetos foram analisados por Anova, seguido pelo teste de Bonferroni.

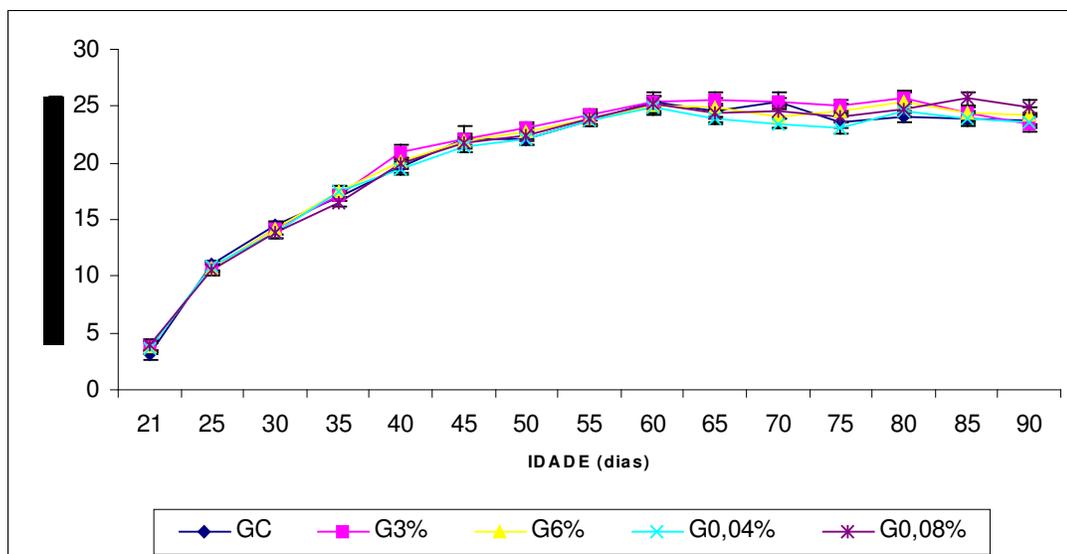
Os resultados dos testes bioquímicos foram analisados por Anova e a discriminação das médias pelo teste de Duncan (GOMES-PIMENTEL,1990).

## 5. RESULTADOS

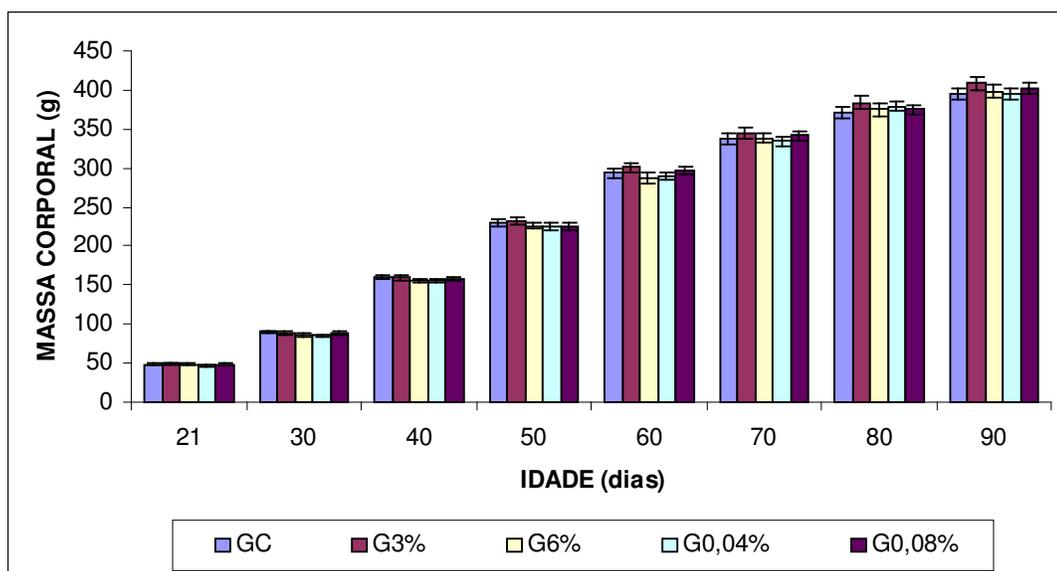
### 5.1 – Consumo diário de ração e efeito da ingestão de café ou cafeína sobre o peso corporal dos ratos – Bloco A

O consumo diário de ração pelos grupos que receberam dieta controle e suplementada está representado na Figura 3. Nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos que ingeriram dieta contendo extrato de café ou cafeína quando comparados com o grupo que não recebeu suplementação na dieta ( $P < 0,05$ ).

Os resultados da ingestão de café ou cafeína sobre o peso corporal dos ratos estão mostrados na Figura 4. A adição de café (3% ou 6%) ou cafeína (0,04% ou 0,08%) nas dietas não alterou as massas corporais dos grupos suplementados em relação ao grupo controle.



**Figura 3** - Consumo diário médio de ração dos grupos de ratos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16). GC representa o grupo que recebeu dieta controle; G3% representa o grupo que recebeu dieta controle suplementada com extrato de café a 3%; G6% indica o grupo que recebeu dieta suplementada com extrato de café a 6%; G0,04%, o grupo que recebeu dieta controle suplementada com 0,04% de cafeína anidra; e G0,08%, o grupo que recebeu dieta suplementada com 0,08% de cafeína anidra. Nenhuma diferença significativa ( $P < 0,05$  – Teste de Duncan) foi observada no consumo de ração entre os grupos suplementados e controle.



**Figura 4** - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína sobre o peso corporal dos ratos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16). GC representa o grupo que recebeu dieta controle; G3% representa o grupo que recebeu dieta controle suplementada com extrato de café a 3%; G6% indica o grupo que recebeu dieta suplementada com extrato de café a 6%; G0,04%, o grupo que recebeu dieta controle suplementada com 0,04% de cafeína anidra; e G0,08%, o grupo que recebeu dieta suplementada com 0,08% de cafeína anidra. Nenhuma diferença significativa ( $P < 0,05$  – Teste de Duncan) foi observada no peso corporal entre os grupos suplementados e controle.

## 5.2 – Testes comportamentais

### 5.2.1 – Campo aberto (open field)

Os resultados do efeito da suplementação da dieta com café ou cafeína sobre a atividade exploratória e locomotora dos animais, avaliada pelo teste do campo aberto, estão mostrados nas tabelas 3 e 4.

A ingestão de café ou cafeína na dieta não modificou o número de crossing e rearing no teste do campo aberto quando comparado ao grupo controle. Este resultado indica que a presença de café ou cafeína na dieta não aumentou a atividade exploratória destes animais. Todos os grupos experimentais apresentaram menor atividade exploratória e locomotora no 2º dia (menor número de crossing e rearing) ( $P < 0,05$ ), ou seja, todos os grupos apresentaram memória não-associativa intacta.

**Tabela 3** - Teste do campo aberto: número de crossing avaliado em dois dias consecutivos

	<b>CROSSING - 1º DIA</b>	<b>CROSSING - 2º DIA</b>
<b>GC</b>	62,3 ± 4,0 <sup>a</sup>	47,5 ± 4,2 <sup>b</sup>
<b>G3%</b>	61,7 ± 4,1 <sup>a</sup>	38,0 ± 4,9 <sup>b</sup>
<b>G6%</b>	65,4 ± 4,5 <sup>a</sup>	42,8 ± 2,4 <sup>b</sup>
<b>G0,04%</b>	66,6 ± 5,0 <sup>a</sup>	37,6 ± 4,8 <sup>b</sup>
<b>G0,08%</b>	62,1 ± 3,7 <sup>a</sup>	38,1 ± 4,3 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em média ± EPM (n= 16). Não houve diferença significativa entre os grupos no mesmo dia pelo Teste de Duncan ( $P < 0,05$ ). Letras sobrescritas distintas indicam diferença significativa no mesmo grupo do 1º para o 2º dia (Teste de Duncan -  $P < 0,05$ ). Crossing é definido como o número de vezes que o animal mudou de quadrado na caixa de acrílico. GC representa o grupo controle; G3%, o grupo suplementado com extrato de café 3%; G6%, o grupo suplementado com extrato de café 6%; G0,04%, o grupo suplementado com cafeína 0,04% e G0,08%, o grupo suplementado com cafeína 0,08%.

**Tabela 4** - Teste do campo aberto: número de rearing avaliado em dois dias consecutivos

	<b>REARING - 1<sup>o</sup> DIA</b>	<b>REARING - 2<sup>o</sup> DIA</b>
<b>GC</b>	13,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	8,1 ± 1,1 <sup>b</sup>
<b>G3%</b>	9,3 ± 1,3 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,6 <sup>b</sup>
<b>G6%</b>	12,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,8 <sup>b</sup>
<b>G0,04%</b>	14,5 ± 2,5 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,9 <sup>b</sup>
<b>G0,08%</b>	12,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	6,3 ± 1,1 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em média ± EPM (n= 16). Não houve diferença significativa entre os grupos no mesmo dia pelo Teste de Duncan (P< 0,05). Letras sobrescritas distintas indicam diferença significativa no mesmo grupo do 1<sup>o</sup> para o 2<sup>o</sup> dia (Teste de Duncan - P< 0,05). Rearing significa o número de vezes que o animal se levantou nas patas traseiras. GC representa o grupo controle; G3%, o grupo suplementado com extrato de café 3%; G6%, o grupo suplementado com extrato de café 6%; G0,04%, o grupo suplementado com cafeína 0,04% e G0,08%, o grupo suplementado com cafeína 0,08%.

### **5.2.2 – Memória de reconhecimento de objetos – preferência por objeto novo**

Na fase de treino, o tempo total de exploração dos objetos pelos animais dos diferentes grupos está apresentado na tabela 5. A suplementação da dieta com café ou cafeína não afetou o tempo total de exploração em ambos os objetos na fase de treino quando comparada ao grupo controle.

As figuras 5 a 9 indicam o desempenho de cada grupo no teste de memória de reconhecimento de objetos durante a fase treino e as fases testes realizadas após 90 minutos e 24 horas. Todos os cinco grupos apresentaram índice de discriminação dos objetos estatisticamente maior nas fases de teste quando comparado à fase de treino (P<0,05), o que indica memória de reconhecimento de objetos intacta.

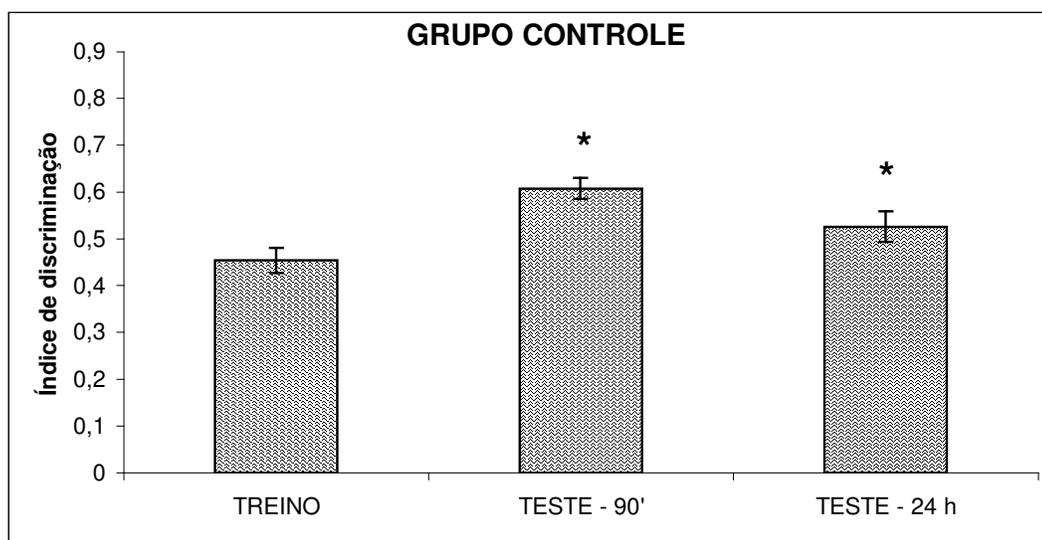
A comparação das fases de treino e de testes entre os grupos experimentais está mostrada nas figuras 10, 11 e 12. Não houve diferença estatística na discriminação dos objetos entre o grupo controle e os grupos suplementados com café ou cafeína durante o treino e durante a fase teste realizada após 90 minutos. Já na fase teste após 24 horas, os grupos que ingeriram café (3% ou 6%) ou cafeína

(0,04% ou 0,08%) na dieta apresentaram melhor performance (maior índice de discriminação) que o grupo controle.

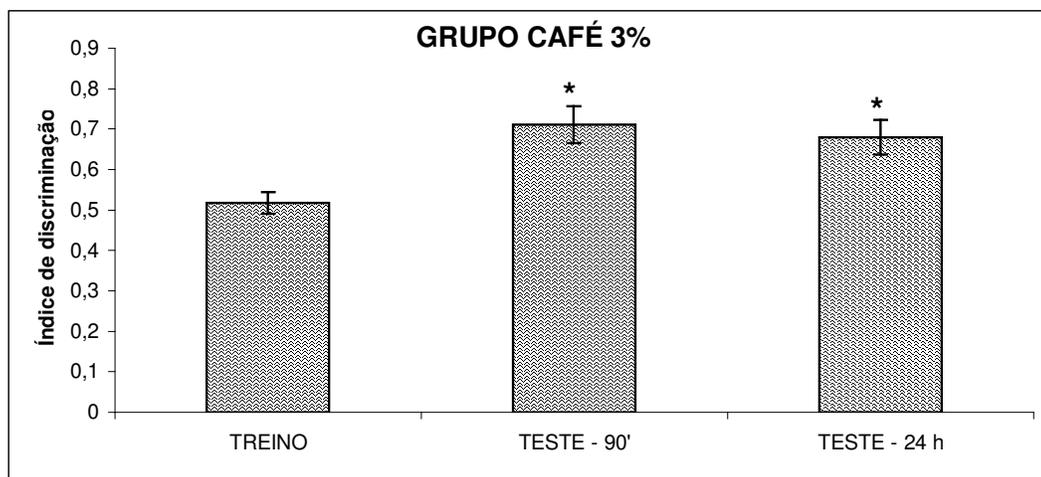
**Tabela 5** - Tempo de exploração total na fase treino no teste de preferência por novo objeto

	EXPLORAÇÃO NA FASE TREINO (S)
<b>GC</b>	34,2 ± 3,7
<b>G3%</b>	29,4 ± 1,9
<b>G6%</b>	26,4 ± 2,5
<b>G0,04%</b>	24,0 ± 3,3
<b>G0,08%</b>	28,9 ± 2,3

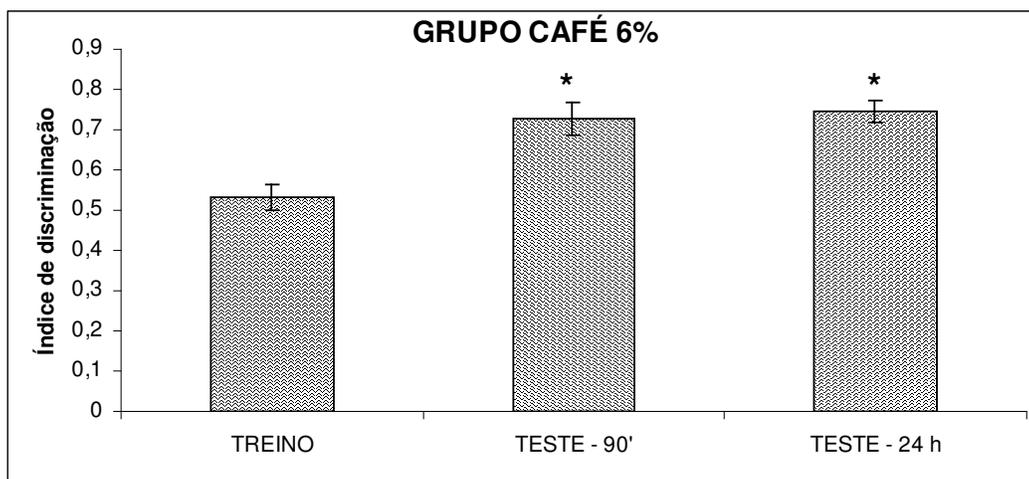
Dados demonstram o tempo total de exploração dos objetos na fase de treino em segundos. Os resultados estão expressos em média ± EPM (n= 16). Não houve diferença significativa (P< 0,05) pelo Teste de Duncan. GC representa o grupo controle; G3%, o grupo suplementado com extrato de café 3%; G6%, o grupo suplementado com extrato de café 6%; G0,04%, o grupo suplementado com cafeína 0,04% e G0,08%, o grupo suplementado com cafeína 0,08%.



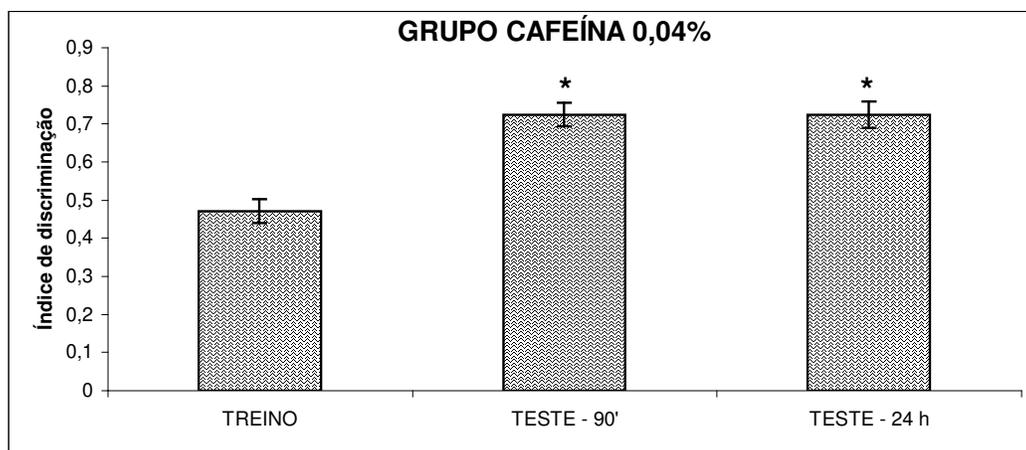
**Figura 5** - Teste de reconhecimento de objetos do grupo controle. Os valores são expressos como média ± EPM (n=16). O índice de discriminação é calculado como o tempo gasto por cada animal explorando o novo objeto dividido pelo tempo total de exploração de ambos os objetos, na fase treino e teste após 90 minutos e após 24 horas. \* p<0,05 em relação à fase treino (Teste de Bonferroni).



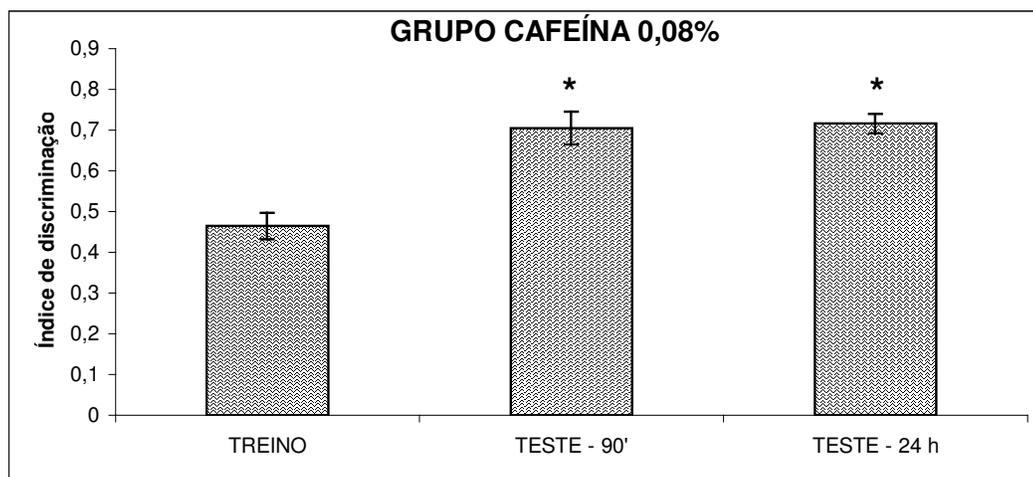
**Figura 6** - Teste de reconhecimento de objetos do grupo suplementado com extrato de café 3%. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16). O índice de discriminação é calculado como o tempo gasto por cada animal explorando o novo objeto dividido pelo tempo total de exploração de ambos os objetos, na fase treino e teste após 90 minutos e após 24 horas. \*  $p < 0,05$  em relação à fase treino (Teste de Bonferroni).



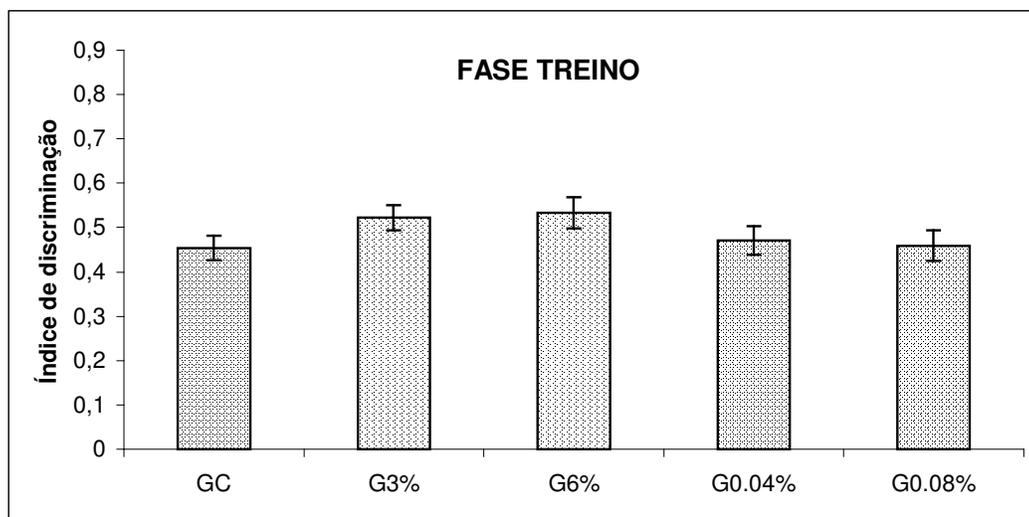
**Figura 7** - Teste de reconhecimento de objetos do grupo suplementado com extrato de café 6%. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16). O índice de discriminação é calculado como o tempo gasto por cada animal explorando o novo objeto dividido pelo tempo total de exploração de ambos os objetos, na fase treino e teste após 90 minutos e após 24 horas. \*  $p < 0,05$  em relação à fase treino (Teste de Bonferroni).



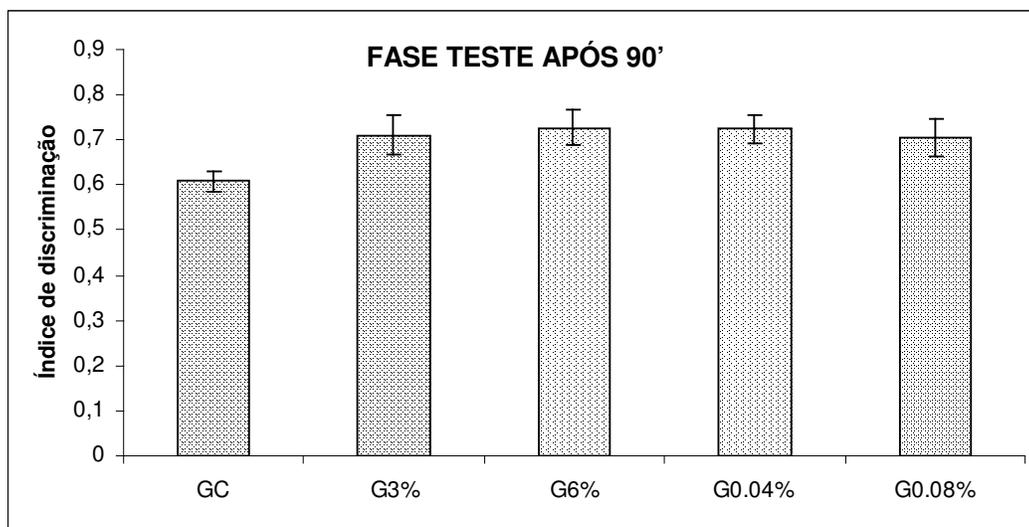
**Figura 8** - Teste de reconhecimento de objetos do grupo suplementado com cafeína 0,04%. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16). O índice de discriminação é calculado como o tempo gasto por cada animal explorando o novo objeto dividido pelo tempo total de exploração de ambos os objetos, na fase treino e teste após 90 minutos e após 24 horas. \*  $p < 0,05$  em relação à fase treino (Teste de Bonferroni).



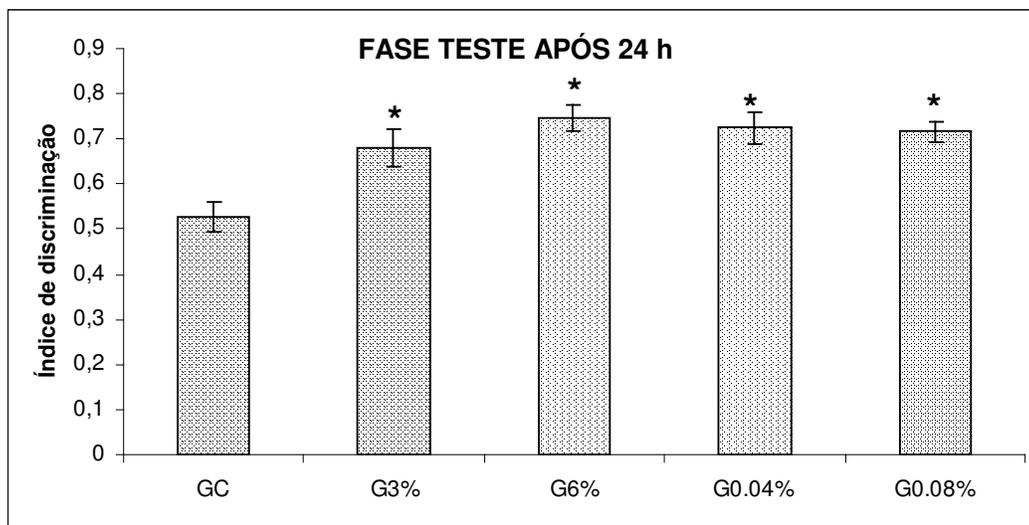
**Figura 9** - Teste de reconhecimento de objetos do grupo suplementado com cafeína 0,08%. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16). O índice de discriminação é calculado como o tempo gasto por cada animal explorando o novo objeto dividido pelo tempo total de exploração de ambos os objetos, na fase treino e teste após 90 minutos e após 24 horas. \*  $p < 0,05$  em relação à fase treino (Teste de Bonferroni).



**Figura 10** - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína na fase treino do teste de memória de reconhecimento de objetos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16). GC representa o grupo que recebeu dieta controle; G3% representa o grupo que recebeu dieta controle suplementada com extrato de café a 3%; G6% indica o grupo que recebeu dieta suplementada com extrato de café a 6%; G0,04%, o grupo que recebeu dieta controle suplementada com 0,04% de cafeína anidra; e G0,08%, o grupo que recebeu dieta suplementada com 0,08% de cafeína anidra. Nenhuma diferença significativa ( $P < 0,05$  – Teste de Bonferroni) foi observada no índice de discriminação entre os grupos suplementados e controle.



**Figura 11** - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína na fase teste após 90 minutos no teste de memória de reconhecimento de objetos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16). GC representa o grupo que recebeu dieta controle; G3% representa o grupo que recebeu dieta controle suplementada com extrato de café a 3%; G6% indica o grupo que recebeu dieta suplementada com extrato de café a 6%; G0,04%, o grupo que recebeu dieta controle suplementada com 0,04% de cafeína anidra; e G0,08%, o grupo que recebeu dieta suplementada com 0,08% de cafeína anidra. Nenhuma diferença significativa ( $P < 0,05$  – Teste de Bonferroni) foi observada no índice de discriminação entre os grupos suplementados e controle.

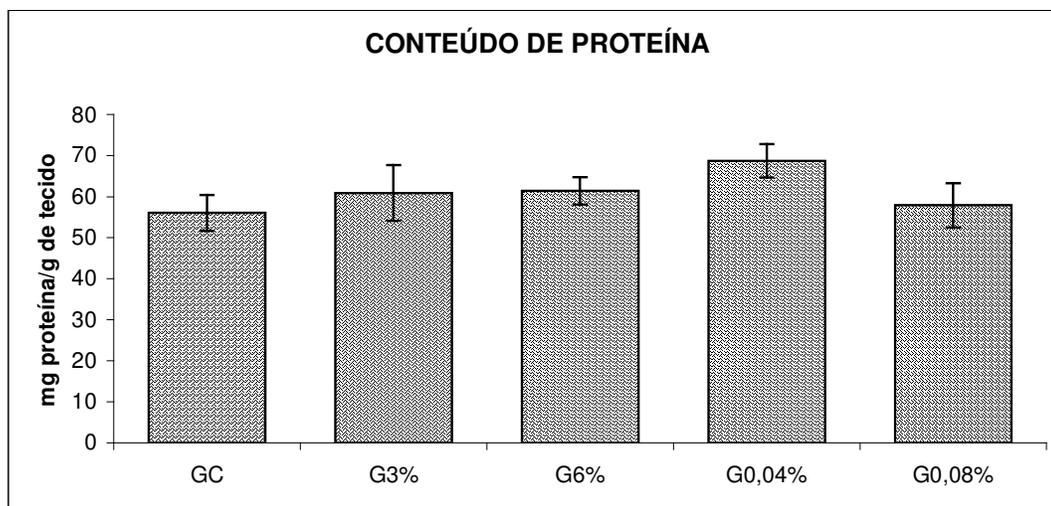


**Figura 12** - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína na fase teste após 24 horas no teste de memória de reconhecimento de objetos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=16). GC representa o grupo que recebeu dieta controle; G3% representa o grupo que recebeu dieta controle suplementada com extrato de café a 3%; G6% indica o grupo que recebeu dieta suplementada com extrato de café a 6%; G0,04%, o grupo que recebeu dieta controle suplementada com 0,04% de cafeína anidra; e G0,08%, o grupo que recebeu dieta suplementada com 0,08% de cafeína anidra. \* $p < 0,05$  (Teste de Bonferroni).

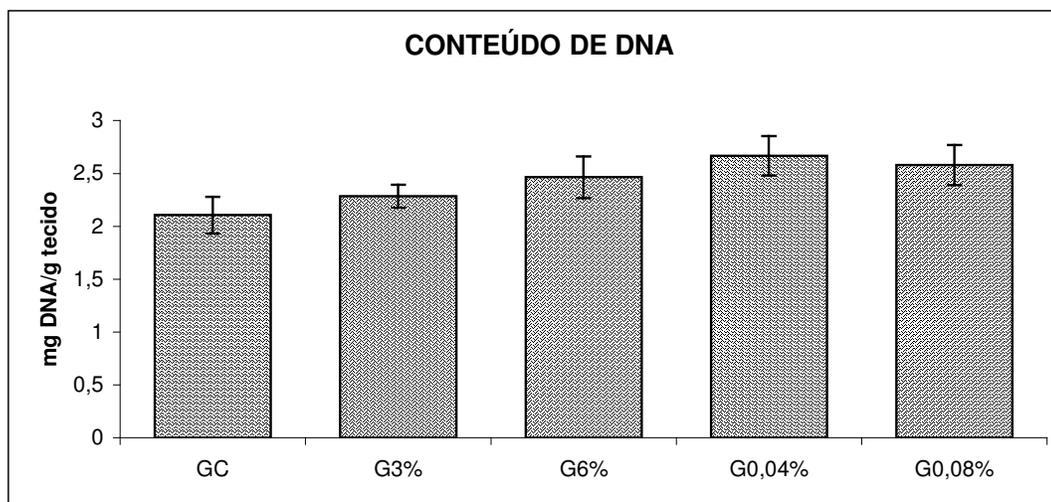
### 5.3 – Medidas bioquímicas

#### 5.3.1 – Conteúdo de proteína e DNA

As Figuras 13 e 14 apresentam, respectivamente, os resultados dos conteúdos médios de proteína e DNA dos tecidos cerebrais dos cinco grupos estudados. Os resultados, expressos em mg de proteína por g de tecido e mg de DNA por g de tecido, não apresentaram diferença estatística no grupo controle e nos grupos que ingeriram dieta suplementada com café ou cafeína ( $P < 0,05$ ).



**Figura 13** - Conteúdo de proteína no tecido cerebral de ratos submetidos a diferentes tratamentos dietéticos. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=8$ ). GC representa o grupo controle; G3%, o grupo suplementado com extrato de café 3%; G6%, o grupo suplementado com extrato de café 6%; G0,04%, o grupo suplementado com cafeína 0,04% e G0,08%, o grupo suplementado com cafeína 0,08%.

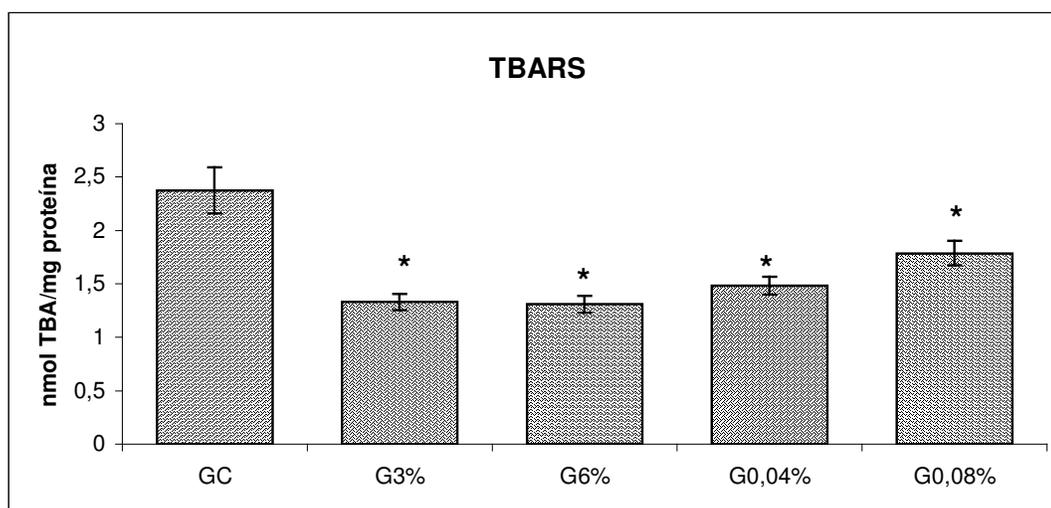


**Figura 14** - Conteúdo de DNA no tecido cerebral de ratos submetidos a diferentes tratamentos dietéticos. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=8$ ). GC representa o grupo controle; G3%, o grupo suplementado com extrato de café 3%; G6%, o grupo suplementado com extrato de café 6%; G0,04%, o grupo suplementado com cafeína 0,04% e G0,08%, o grupo suplementado com cafeína 0,08%.

### 5.3.2 – Peroxidação de lipídeos (TBARS)

Os resultados da ação protetora da ingestão de café ou cafeína sobre a peroxidação de lipídeos de membranas estão apresentados na figura 15.

A ingestão de café ou cafeína na dieta provocou redução significativa média de 38% no índice de peroxidação dos animais suplementados em relação aos animais do grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos café (3% ou 6%) e cafeína (0,04% ou 0,08%).



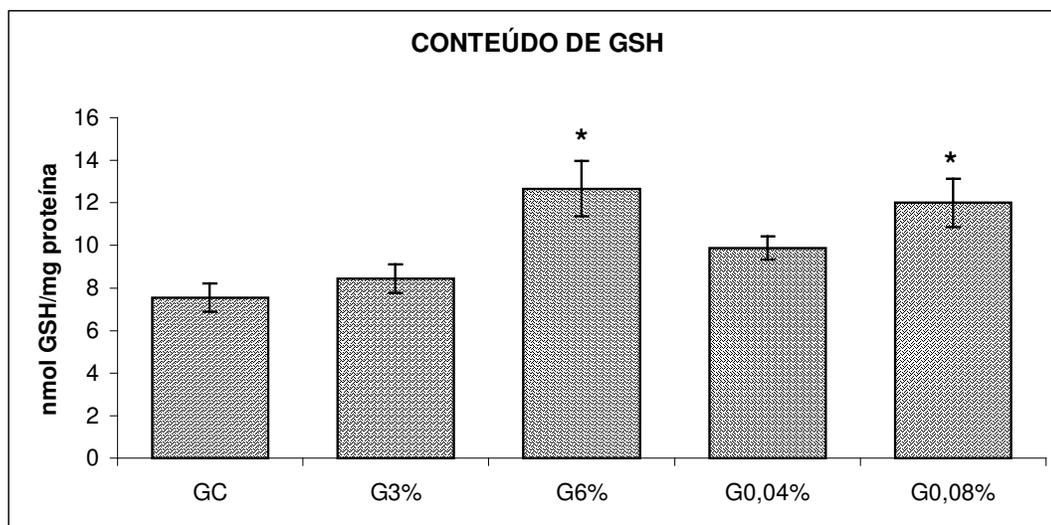
**Figura 15** - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre índice de peroxidação de lipídeos em tecido cerebral de ratos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=8). GC representa o grupo controle; G3%, o grupo suplementado com extrato de café 3%; G6%, o grupo suplementado com extrato de café 6%; G0,04%, o grupo suplementado com cafeína 0,04% e G0,08%, o grupo suplementado com cafeína 0,08%. \*p<0,05 (Teste de Duncan).

### 5.3.3 – Conteúdo de GSH

A figura 16 apresenta os resultados do conteúdo de glutatona reduzida no cérebro de ratos submetidos aos diferentes tratamentos dietéticos.

Os animais que ingeriram dieta suplementada com café 3% e com cafeína 0,04% apresentaram conteúdo de GSH não diferente estatisticamente do grupo controle.

Porém, a ingestão de café 6% e cafeína 0,08% na dieta promoveu um aumento de cerca de 60% no teor de glutatona reduzida dos ratos.

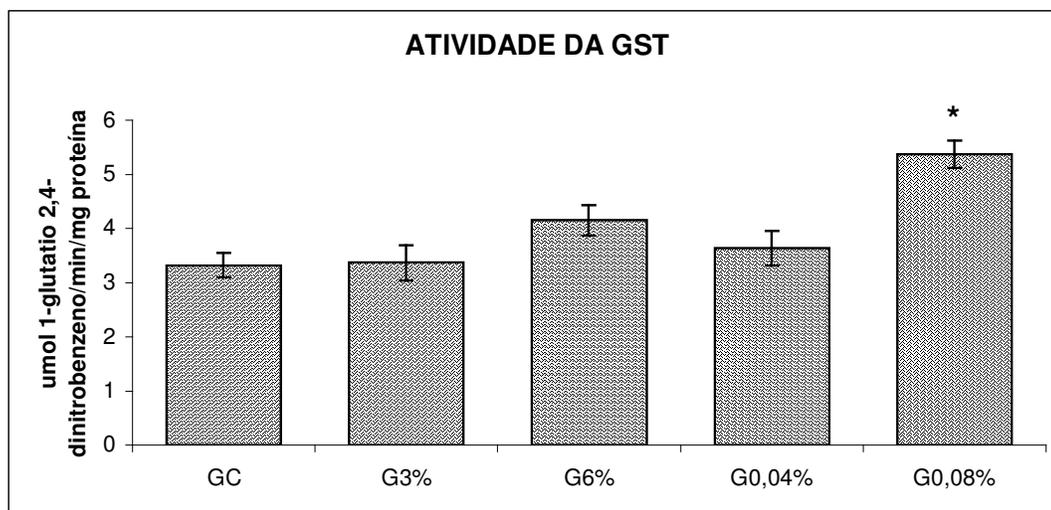


**Figura 16** - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) em tecido cerebral de ratos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=8). GC representa o grupo controle; G3%, o grupo suplementado com extrato de café 3%; G6%, o grupo suplementado com extrato de café 6%; G0,04%, o grupo suplementado com cafeína 0,04% e G0,08%, o grupo suplementado com cafeína 0,08%. \*p<0,05 (Teste de Duncan).

#### 5.3.4 – Atividade enzimática da glutathiona-S-transferase (GST)

Somente os animais que receberam suplementação na dieta de cafeína 0,08% apresentaram um aumento significativo de 62% na atividade da enzima GST. Apesar do grupo café 6% ter demonstrado uma tendência no aumento da atividade desta enzima, este juntamente com os grupos café 3% e cafeína 0,04% não apresentaram diferença estatística na atividade enzimática da GST comparada ao grupo controle.

Os resultados dos diferentes tratamentos sobre a atividade da glutathiona-S-transferase estão apresentados na figura 17.



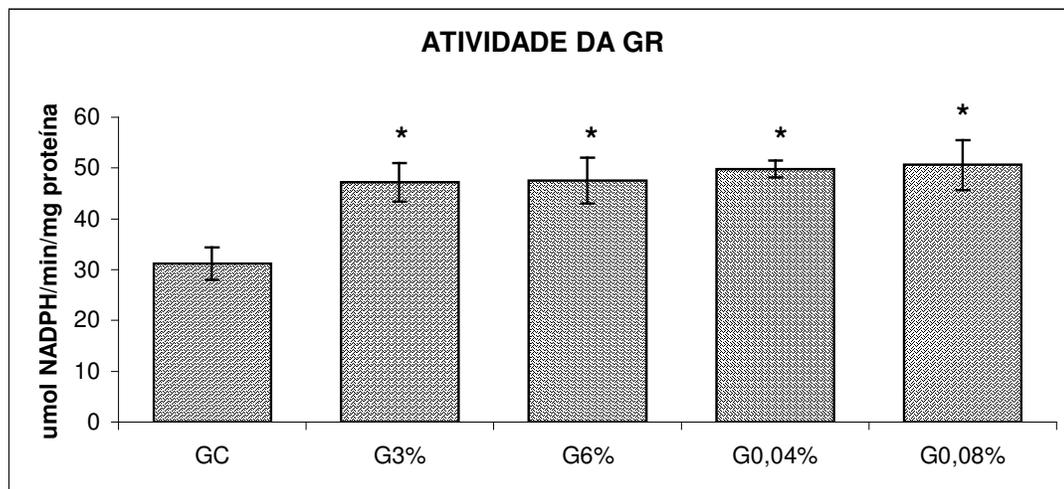
**Figura 17** - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre a atividade enzimática da glutiona-S-transferase (GST) em tecido cerebral de ratos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=8). GC representa o grupo controle; G3%, o grupo suplementado com extrato de café 3%; G6%, o grupo suplementado com extrato de café 6%; G0,04%, o grupo suplementado com cafeína 0,04% e G0,08%, o grupo suplementado com cafeína 0,08%. \* $p < 0,05$  (Teste de Duncan).

### 5.3.5 – Atividade enzimática da glutiona redutase (GR) e glutiona peroxidase (GPx)

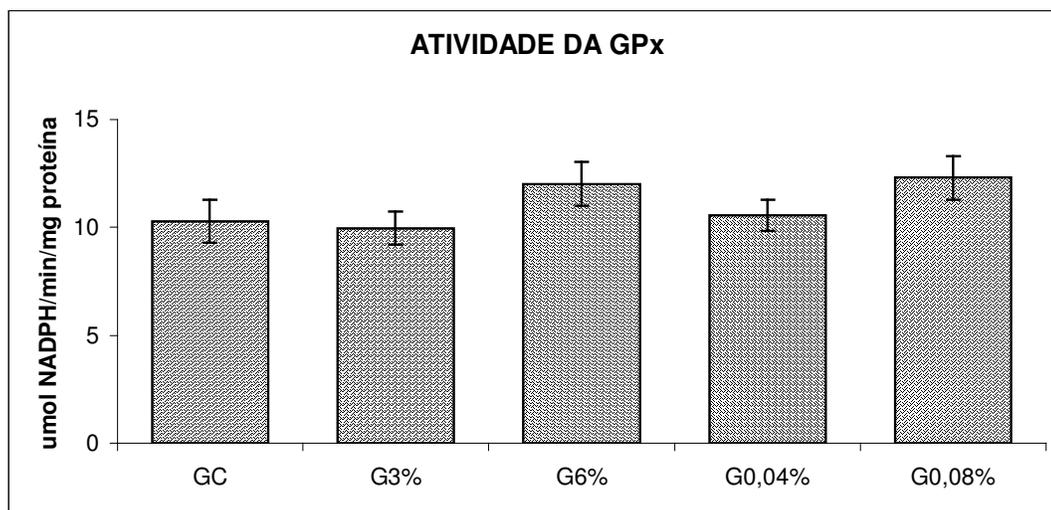
As figuras 18 e 19 apresentam, respectivamente, os resultados da ação da ingestão de café ou cafeína na atividade das enzimas glutiona redutase e glutiona peroxidase em tecido cerebral.

A suplementação da dieta com café ou cafeína provocou aumento significativo médio de 54% na atividade da GR dos animais suplementados em relação aos animais do grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos café (3% ou 6%) e cafeína (0,04% ou 0,08%).

Não foi detectado efeito da suplementação de café (3% e 6%) ou cafeína (0,04% e 0,08%) na dieta sobre a atividade da enzima glutiona peroxidase.



**Figura 18** - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre a atividade enzimática da glutathiona redutase (GR) em tecido cerebral de ratos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=8). GC representa o grupo controle; G3%, o grupo suplementado com extrato de café 3%; G6%, o grupo suplementado com extrato de café 6%; G0,04%, o grupo suplementado com cafeína 0,04% e G0,08%, o grupo suplementado com cafeína 0,08%. \* $p < 0,05$  (Teste de Duncan).

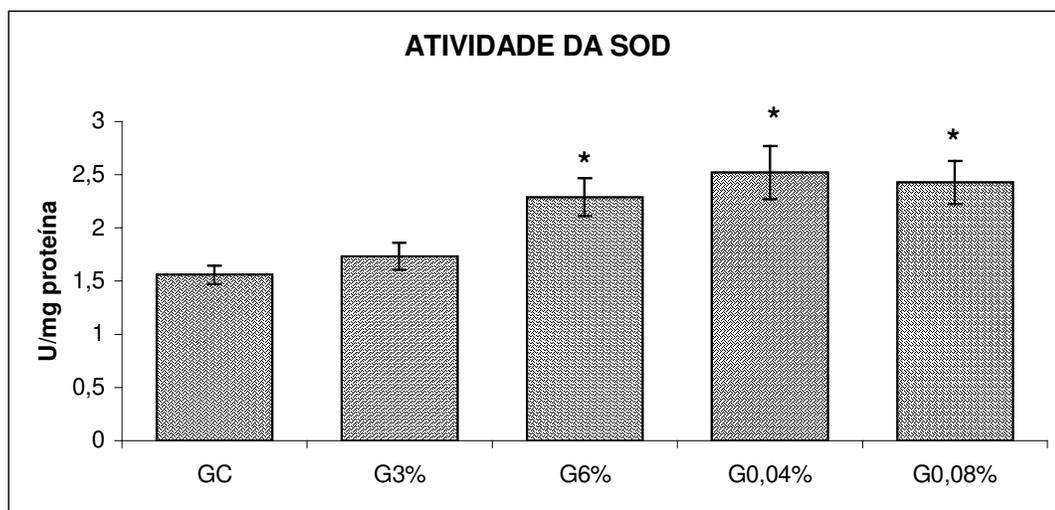


**Figura 19** - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre a atividade enzimática da glutathiona peroxidase (GPx) em tecido cerebral de ratos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=8). GC representa o grupo controle; G3%, o grupo suplementado com extrato de café 3%; G6%, o grupo suplementado com extrato de café 6%; G0,04%, o grupo suplementado com cafeína 0,04% e G0,08%, o grupo suplementado com cafeína 0,08%. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).

### 5.3.6 – Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase teve sua atividade aumentada em cerca de 54% nos animais que ingeriram dieta contendo extrato de café 6% ou cafeína 0,04% e 0,08%, quando comparados com o grupo controle. Somente a ingestão de dieta suplementada com café 3% não afetou significativamente a atividade desta enzima ( $P < 0,05$ ).

Os resultados dos efeitos dos diferentes tratamentos dietéticos sobre a atividade da superóxido dismutase estão apresentados na figura 20.



**Figura 20** - Efeito da ingestão de café ou cafeína sobre a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em tecido cerebral de ratos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=8$ ). GC representa o grupo controle; G3%, o grupo suplementado com extrato de café 3%; G6%, o grupo suplementado com extrato de café 6%; G0,04%, o grupo suplementado com cafeína 0,04% e G0,08%, o grupo suplementado com cafeína 0,08%. \* $p < 0,05$  (Teste de Duncan).

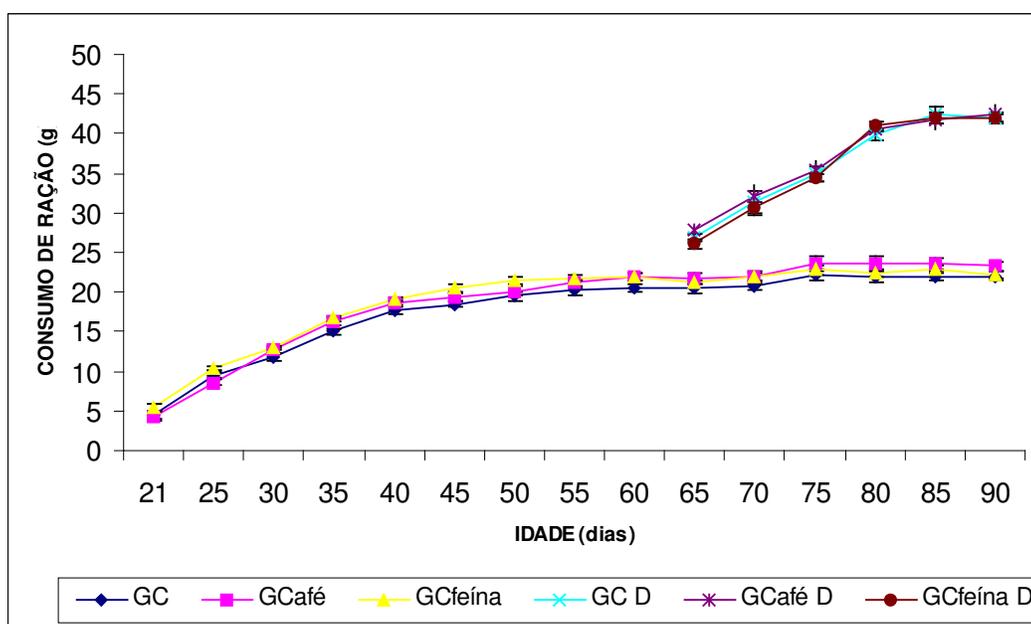
### 5.4 – Consumo diário de ração e efeito da ingestão de café ou cafeína sobre o peso corporal dos ratos – Bloco B

O consumo diário de ração dos grupos que receberam dieta controle e dieta suplementada está representado na Figura 21. Nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos que ingeriram dieta contendo extrato de café ou cafeína

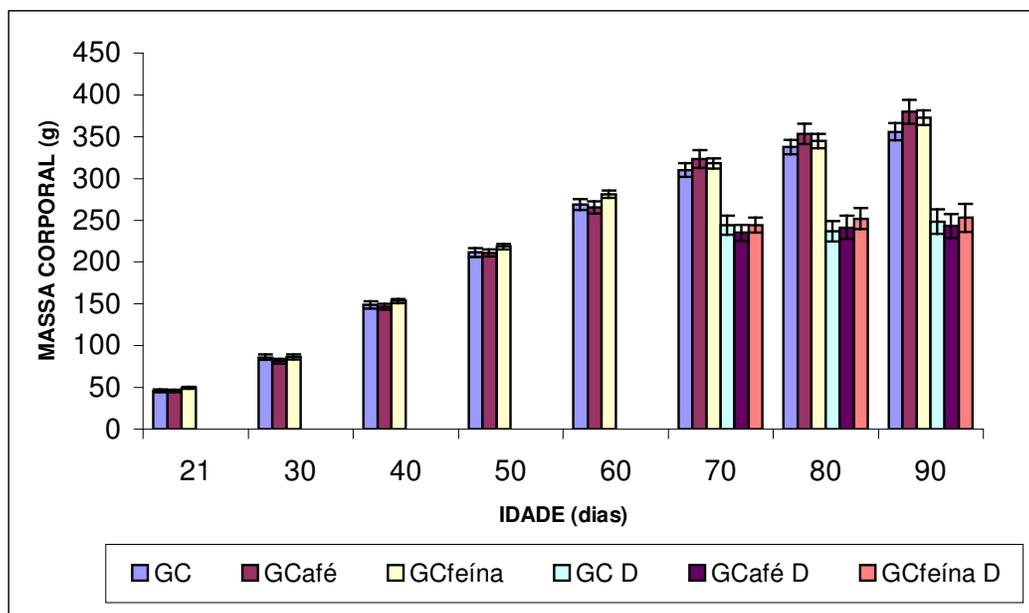
quando comparados com o grupo que não recebeu suplementação na dieta ( $P < 0,05$ ). Aos 60 dias de vida, metade dos animais de cada grupo foi submetida a um tratamento para indução de diabetes. Os grupos controle com diabetes (GC D), café com diabetes (GCafé D) e cafeína com diabetes (GCfeína D) apresentaram uma maior ingestão diária de ração quando comparados com os grupos não diabéticos.

A adição de extrato de café 6% ou cafeína 0,08% nas dietas não alterou as massas corporais dos grupos suplementados em relação ao grupo controle. Contudo, a indução de diabetes aos 60 dias de vida em metade dos animais de cada grupo provocou uma diminuição na massa corporal desses animais quando comparados aos não diabéticos.

Os resultados da ingestão de café ou cafeína sobre o peso corporal dos ratos estão mostrados na Figura 22.



**Figura 21** – Consumo diário médio de ração dos grupos de ratos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=18$ ). GC representa o grupo que recebeu dieta controle; GCafé representa o grupo que recebeu dieta controle suplementada com extrato de café a 6%; GCfeína, o grupo que recebeu dieta controle suplementada com 0,08% de cafeína anidra. Aos 60 dias de vida, metade dos animais de cada grupo foi submetida a um tratamento para indução de diabetes, formando os grupos GC D, grupo controle com diabetes; GCafé D, grupo café 6% com diabetes; e GCfeína D, grupo cafeína 0,08% com diabetes. Nenhuma diferença significativa foi observada no consumo de ração entre os grupos suplementados e controle. Os grupos com diabetes apresentaram maior ingestão diária de ração que os grupos não diabéticos ( $P < 0,05$  – Teste de Duncan).



**Figura 22** - Efeito da dieta suplementada com café ou cafeína sobre o peso corporal dos ratos. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n=18). GC representa o grupo que recebeu dieta controle; GCafé representa o grupo que recebeu dieta controle suplementada com extrato de café a 6%; GCfeína, o grupo que recebeu dieta controle suplementada com 0,08% de cafeína anidra. Aos 60 dias de vida, metade dos animais de cada grupo foi submetida a um tratamento para indução de diabetes, formando os grupos GC D, grupo controle com diabetes; GCafé D, grupo café 6% com diabetes; e GCfeína D, grupo cafeína 0,08% com diabetes. Nenhuma diferença significativa foi observada no peso corporal entre os grupos suplementados e controle. Os grupos com diabetes apresentaram menor massa corporal quando comparados aos grupos não diabéticos ( $P < 0,05$  – Teste de Duncan).

## 5.5 – Medida da glicose sanguínea

As medidas da glicose sanguínea dos grupos de animais, após o tratamento para indução da diabetes com dose única de injeção de estreptozotocina, estão apresentados na tabela 6.

Os animais que foram submetidos ao tratamento acima descrito desenvolveram diabetes, apresentando um nível de glicose maior que 250 mg/dl, após uma e cinco semanas da injeção com estreptozotocina. Os grupos que receberam somente injeção de tampão de citrato de sódio (controle) apresentaram nível de glicose menor que 250 mg/dl e, portanto, foram considerados não diabéticos.

A ingestão de café ou cafeína na dieta não alterou a glicose sanguínea dos grupos suplementados quando comparados com os grupos controle.

**Tabela 6** - Medida da glicose sanguínea dos ratos avaliada após 1 e 5 semanas da indução de diabetes com streptozotocina

	<b>GLICOSE SANGUÍNEA (mg/dl)</b>	
	<b>1 semana</b>	<b>5 semanas</b>
<b>GC</b>	95,3 ± 4,8 <sup>a</sup>	94,7 ± 2,8 <sup>a</sup>
<b>GCafé</b>	92,4 ± 3,6 <sup>a</sup>	89,6 ± 4,3 <sup>a</sup>
<b>GCfeína</b>	90,7 ± 4,2 <sup>a</sup>	88,6 ± 4,4 <sup>a</sup>
<b>GC D</b>	520,1 ± 29,2 <sup>b</sup>	514,2 ± 15,7 <sup>b</sup>
<b>GCafé D</b>	524,6 ± 24,5 <sup>b</sup>	512,4 ± 35,6 <sup>b</sup>
<b>GCfeína D</b>	515,9 ± 26,1 <sup>b</sup>	519,6 ± 22,7 <sup>b</sup>

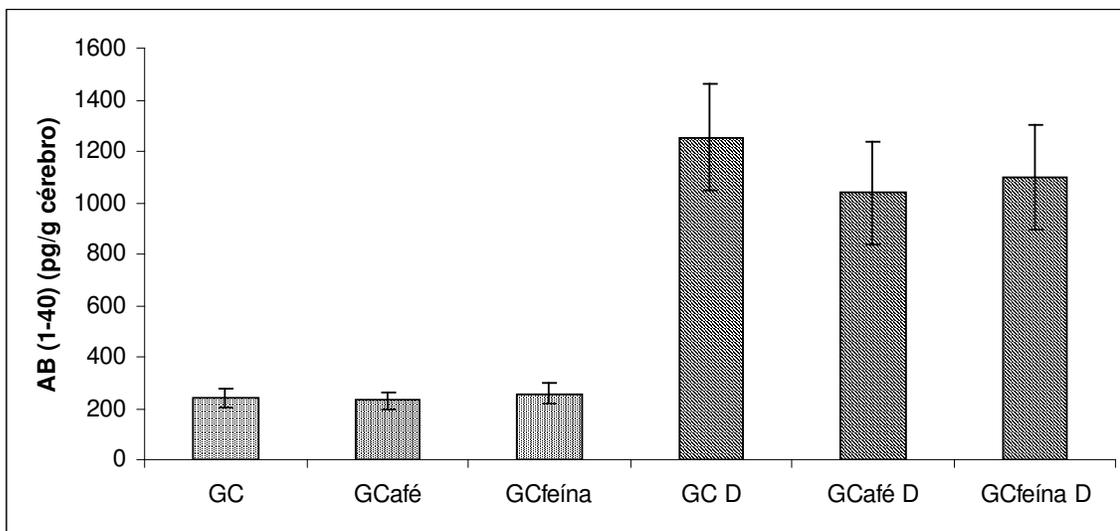
Os resultados estão expressos em média ± EPM (n= 6). Letras sobrescritas distintas indicam diferença significativa (P< 0,05) pelo Teste de Duncan. GC representa o grupo que recebeu dieta controle; GCafé representa o grupo que recebeu dieta controle suplementada com extrato de café a 6%; GCfeína, o grupo que recebeu dieta controle suplementada com 0,08% de cafeína anidra. Aos 60 dias de vida, metade dos animais de cada grupo foi submetida a um tratamento para indução de diabetes, formando os grupos GC D, grupo controle com diabetes; GCafé D, grupo café 6% com diabetes; e GCfeína D, grupo cafeína 0,08% com diabetes. A glicose sanguínea foi medida após 1 e 5 semanas do tratamento para indução de diabetes com injeção de dose única de estreptozotocina.

## 5.6 – Medida da proteína Aβ-amilóide (1-40)

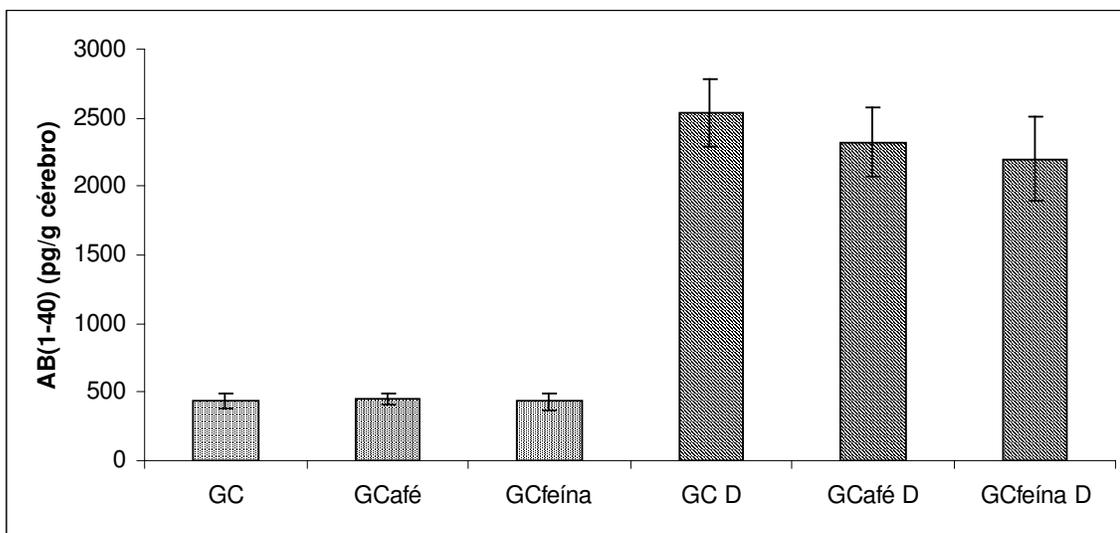
Os níveis da proteína Aβ-amilóide (1-40) no córtex e no hipocampo foram medidos, como mostram as figuras 23 e 24, respectivamente.

A suplementação da dieta com café ou cafeína nos animais não diabéticos não teve nenhum efeito nos níveis de Aβ-amilóide tanto no córtex como no hipocampo, apresentando valores não significativamente diferentes.

A diabetes induzida pela injeção de estreptozotocina aumentou significativamente os níveis de Aβ-amilóide nos tecidos cerebrais dos animais. Apesar do consumo de café ou cafeína na dieta levar a uma tendência em diminuir os níveis de Aβ-amilóide no córtex e no hipocampo dos ratos, não foi observada diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle diabético.



**Figura 23** - Níveis de proteína Aβ-amilóide no córtex dos ratos. Os valores são expressos como média ± EPM (n=6). GC representa o grupo que recebeu dieta controle; GCafé representa o grupo que recebeu dieta controle suplementada com extrato de café a 6%; GCfeína, o grupo que recebeu dieta controle suplementada com 0,08% de cafeína anidra. Aos 60 dias de vida, metade dos animais de cada grupo foi submetida a um tratamento para indução de diabetes, formando os grupos GC D, grupo controle com diabetes; GCafé D, grupo café 6% com diabetes; e GCfeína D, grupo cafeína 0,08% com diabetes. Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de Aβ entre os grupos suplementados e controle. Os grupos com diabetes apresentaram níveis mais elevados de Aβ que os grupos não diabéticos (P<0,05 – Teste de Duncan).



**Figura 24** - Níveis de proteína Aβ-amilóide no hipocampo dos ratos. Os valores são expressos como média ± EPM (n=6). GC representa o grupo que recebeu dieta controle; GCafé representa o grupo que recebeu dieta controle suplementada com extrato de café a 6%; GCfeína, o grupo que recebeu dieta controle suplementada com 0,08% de cafeína anidra. Aos 60 dias de vida, metade dos animais de cada grupo foi submetida a um tratamento para indução de diabetes, formando os grupos GC D, grupo controle com diabetes; GCafé D, grupo café 6% com diabetes; e GCfeína D, grupo cafeína 0,08% com diabetes. Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de Aβ entre os grupos suplementados e controle. Os grupos com diabetes apresentaram níveis mais elevados de Aβ que os grupos não diabéticos (P<0,05 – Teste de Duncan).

## 6. DISCUSSÃO

O caminho para a conquista da saúde passa por uma alimentação balanceada ou equilibrada, dos mais diferentes alimentos. Nenhum alimento é completo, ou seja, nenhum possui todos os nutrientes em quantidade suficiente para atender às necessidades do organismo. Por isso, para que uma alimentação seja saudável é preciso que haja o consumo equilibrado dos nutrientes básicos contidos nos diferentes grupos de alimentos.

Os alimentos têm funções diversas no organismo. Tradicionalmente, encontramos três grupos, de acordo com a sua funcionalidade: energéticos, construtores e reguladores. Os alimentos energéticos fornecem energia para todos os processos metabólicos e para os exercícios realizados pelo corpo. Alguns exemplos são os carboidratos e lipídeos. Os alimentos construtores, também conhecidos como alimentos plásticos, são aqueles responsáveis pela construção e formação do corpo. Participam da formação de sangue, músculos, ossos, cabelos, pele e órgãos, além do sistema imune. As proteínas em geral são exemplos de alimentos construtores. Os alimentos reguladores regulam e controlam as funções do organismo, sendo vitais para o funcionamento e crescimento normal do organismo. Alguns exemplos são as vitaminas e sais minerais (OLIVEIRA & MARCHINI, 2008).

Nas últimas décadas, um quarto grupo de alimentos vem sendo extensamente estudado, os chamados alimentos protetores. Dentro desse grupo estão os alimentos funcionais, que são alimentos que ingeridos diariamente em determinadas quantidades mostram potencial para proteger ou modular o metabolismo e/ou fisiologia do organismo de maneira favorável à prevenção de doenças crônicas degenerativas como hipertensão, diabetes, coronariopatias e doenças neurodegenerativas (ANJO, 2004). Um esforço crescente vem sendo realizado no intuito de se identificarem alimentos que possam inibir, retardar ou reverter os múltiplos eventos fisiopatológicos que levam a essas doenças.

Diferentes constituintes do café têm sido sugeridos como potencialmente protetores em diferentes sistemas químicos e biológicos. Os ácidos clorogênicos constituem os principais e mais abundantes compostos fenólicos com propriedades antioxidantes no café (MONTEIRO & TRUGO, 2005). Estudos mostram que os diterpenos cafeol e cafestol protegem contra a formação de aductos no cólon de

animais (HUBER et al., 1997) e em diferentes sistemas de células humanas e animais, exercendo efeito protetor antimutagênico e anticarcinogênico (CAVIN et al., 2001; CAVIN et al., 2002; MAJER et al., 2005). O consumo de baixas a moderadas doses de cafeína pode resultar em efeito estimulante do sistema nervoso central, com possível diminuição do sono e aumento na capacidade de concentração. No entanto, em altas doses e em indivíduos com sensibilidade aumentada, a cafeína pode causar efeitos negativos como ansiedade, inquietação, insônia e taquicardia (NEHLIG, 1992). Além de exercer efeito sobre o sistema nervoso central, a cafeína é outro constituinte do café com atividade antioxidante (DEVASAGAYAM et al., 1996).

Sob essa perspectiva, o presente estudo investigou o efeito da ingestão diária de café sobre o sistema nervoso central, diminuindo os danos do estresse oxidativo pela modulação do sistema antioxidante endógeno e prevenindo o declínio cognitivo em animais adultos, protegendo, assim, o organismo contra doenças neurodegenerativas.

Os efeitos de componentes isolados do café no sistema antioxidante e no aprendizado e na memória em modelos animais têm sido reportados há vários anos, mas os resultados desses estudos têm se mostrados contraditórios (NEHLIG, 1992; SHI et al. 1991; RIEDEL et al., 1995; SMITH et al., 1994). A maioria desses estudos examina os efeitos agudos desses componentes. Os efeitos em longo prazo do consumo de café no sistema nervoso central de ratos têm sido pobremente caracterizados. Interações funcionais entre seus componentes podem aumentar ou diminuir ações individuais. Sendo assim, este estudo focou nos efeitos do consumo do café ao longo da vida dos animais, o que é mais representativo do consumo humano geral, e qualifica essa bebida dentro da categoria de alimentos funcionais.

Para avaliar o efeito do café como alimento funcional sobre a neuroproteção, os animais receberam ração suplementada com extrato de café (3 e 6%), e as doses correspondentes de 0,04 e 0,08% de cafeína, logo após o desmame e essas foram administradas diariamente ao longo da vida dos animais. De acordo com estudos prévios desenvolvidos pelo nosso grupo e confirmados nesse estudo, a adição de café e cafeína à ração não altera a ingestão da dieta pelos animais, o que reflete no peso corporal semelhante entre os animais que receberam dieta controle e aqueles que receberam dieta suplementada com café e cafeína. As concentrações de 3% e 6% de café na dieta basearam-se em dados da literatura (HUBER et al., 2003; TURESKY et al., 2003). As doses de café e cafeína utilizadas neste modelo

experimental foram elevadas em comparação ao consumo humano diário. O consumo de cafeína estimado nestes animais foi de 38 e 75 mg/kg/dia, para os tratamentos de 3% e 6%, respectivamente. Já o consumo estimado diário de cafeína em humanos que bebem de 2 a 4 xícaras de café é de aproximadamente 4 a 8 mg cafeína/kg de peso corporal e para fortes consumidores de café, a quantidade pode chegar a 15 mg/kg (TURESKY et al., 2003). O metabolismo mais acelerado nos ratos justifica a maior quantidade de café administrada aos animais.

Os valores do conteúdo de DNA no tecido cerebral dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos dietéticos não diferiram significativamente e foram comparáveis aos valores médios de DNA/célula descritos na literatura (BREGNARD et al., 1975). Isto demonstra que a ploidia das células não foi afetada pela ação da ingestão de café ou cafeína.

Como em todos os outros órgãos, a capacidade funcional do cérebro deteriora com o passar do tempo. Eventos patológicos como o estresse oxidativo, devido à elevada geração de radicais livres e espécies reativas do oxigênio ou nitrogênio, com subsequente aumento da modificação oxidativa de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos contribuem de maneira significativa para a perda de funcionalidade do cérebro (SCHIMITT-SCHILLIG et al., 2005). Os resultados obtidos neste estudo mostram que a ingestão diária de café ou cafeína na dieta foi eficaz em aumentar a proteção do cérebro contra danos oxidativos, contribuindo, assim, para um retardamento em sua deterioração, já que diminuiu a peroxidação de lipídeos das membranas, aumentou a concentração de glutathione, um potente antioxidante endógeno, e aumentou a atividade de diferentes enzimas antioxidantes.

Um importante efeito demonstrado pela ingestão de café ou cafeína nesse estudo foi a diminuição do índice de peroxidação de lipídeos (TBARS) no tecido cerebral dos ratos. Isso porque as membranas neuronais possuem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, que são especialmente propensos em sofrer reações de peroxidação lipídica, resultando na formação de aldeídos citotóxicos, como o malonaldeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (HNE) (SCHIMITT-SCHILLIG et al., 2005). Este efeito protetor do café e da cafeína sobre as membranas confirma estudos anteriores de DEVASAGAYAN et al. (1996) que mostraram *in vitro* os efeitos antioxidantes do café, provavelmente devido à cafeína que protegeria as membranas contra danos oxidativos, pelo seqüestro de espécies reativas de oxigênio, em animais de 90 dias de vida expostos à radiação gama. Esses estudos mostraram

que a capacidade da cafeína em inibir a peroxidação lipídica é similar à da glutathione e significativamente maior que a do ácido ascórbico. Nossos resultados demonstraram que essa atividade antioxidante da cafeína sobre as membranas neuronais é provavelmente modulada no café, pela atividade biológica de outros compostos da bebida. Sendo assim, não se pode descartar a importância dos componentes fenólicos identificados no café, principalmente os ácidos clorogênicos, na capacidade antioxidante da bebida. Diversos estudos já demonstraram os efeitos protetores dos componentes fenólicos do café contra o estresse oxidativo (NATELLA et al., 2002; LEE & ZHU, 2006; CHO et al., 2009). Além disso, a ação antioxidante do extrato de café foi verificada tanto em sistema químico como em biológico, sendo capaz de inibir a formação de radicais peróxil e, conseqüentemente, a peroxidação lipídica (DAGLIA et al., 2000), além de suprimir a mutagenicidade de oxidantes como ter-butil-hidroperóxido (STADLER et al., 1994).

As maiores doses de café e cafeína (6% e 0,08%, respectivamente) adicionadas à dieta provocaram um aumento no conteúdo de glutathione reduzida (GSH) no tecido cerebral. CAVIN et al. (2002) mostraram, em cultura primária de hepatócitos, um aumento dose-dependente na concentração intracelular de GSH em ratos alimentados com café. De acordo com HUBER et al. (2003), o aumento nos níveis de glutathione (GSH), é aparentemente devido a indução da  $\gamma$ -glutamyl-cisteina-sintetase (GCS), a enzima limitante na síntese de GSH. Como a glutathione protege as células contra danos causados por compostos eletrofílicos, radicais livres e intermediários reativos do oxigênio, atuando como potente antioxidante endógeno (MORTON & MITCHELL, 1985), a ingestão diária de dieta suplementada com café ou cafeína pode ser considerada uma possível intervenção capaz de diminuir ou inibir o estresse oxidativo nas células neuronais, com conseqüente redução da perda da capacidade funcional do cérebro.

Somente os animais que receberam suplementação na dieta de cafeína 0,08% apresentaram um aumento significativo na atividade da enzima glutathione-S-transferase, com o grupo café 6% apenas demonstrando uma tendência no aumento da atividade dessa enzima. Apesar de neste estudo a ingestão de café não ter levado a um aumento da atividade da GST, estudos como o de TURESKY et al. (2003) têm demonstrado que o tratamento com café resulta em um aumento na expressão e na atividade dessa enzima. Em estudos no fígado, os diterpenos, cafeol e cafestol, presentes no café mostraram ser importantes componentes responsáveis por este

efeito. CAVIN et al. (2002), por exemplo, mostraram que os níveis de atividade e de mRNA de todos os subtipos de GST aumentam duas a três vezes durante a exposição a uma dieta de 10 dias contendo 2000 ppm de cafeol e cafeol. Em nosso estudo, pudemos demonstrar que o aumento na atividade da glutathione-S-transferase no cérebro de ratos é provavelmente devido a ação da cafeína, por mecanismos ainda não conhecidos.

Apesar de a atividade da enzima glutathione peroxidase não ter sofrido nenhuma influência dos diferentes tratamentos dietéticos avaliados no presente estudo, a suplementação da dieta com café ou cafeína foi efetiva em aumentar as atividades das enzimas antioxidantes glutathione redutase e superóxido dismutase. Esses resultados estão de acordo com outros estudos (BICHLER et al., 2007; NOSCHANG et al., 2009) onde a administração de café ou cafeína aumentou a atividade de enzimas antioxidantes. LIU e colaboradores (2003) demonstraram que a administração sistêmica crônica de sequestradores catalíticos sintéticos de ROS (como análogos da superóxido dismutase e catalase) a camundongos entre 8 e 11 semanas de vida, durante 3 meses, quase reverteu completamente não somente o aumento do dano oxidativo no cérebro, mas também os déficits cognitivos. Além disso, o extrato de café torrado mostrou aumentar a atividade antioxidante plasmática em humanos, possivelmente devido à ação de seus compostos fenólicos (NATELLA et al., 2002).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram, portanto, um efeito benéfico do café, como alimento funcional, sobre a modulação do sistema antioxidante endógeno no sistema nervoso central de ratos. Uma das teorias propostas para explicar os processos do envelhecimento e o aparecimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, é a de que radicais livres são responsáveis, por causa de sua alta reatividade, pelos danos associados à idade em nível celular e tecidual, devido às modificações oxidativas que causam nas moléculas biológicas (lipídios, proteínas e ácidos nucleicos) (HARMAN, 1957). Essa teoria embasa a importância de se estudar mais profundamente os efeitos do café, um componente usual da dieta frequentemente consumido na vida adulta, pois esse tem mostrado um importante potencial em modular os processos relacionados ao envelhecimento e em retardar o surgimento de doenças neurodegenerativas associadas à idade.

Além dos efeitos protetores do café sobre o sistema antioxidante endógeno, os resultados do presente estudo demonstraram outra importante ação do consumo diário de café na melhora da qualidade de vida de pessoas adultas e idosas, já que este alimento funcional demonstrou também agir de maneira benéfica na performance cognitiva de animais adultos. Nossos resultados mostraram que os grupos que ingeriram café (3% ou 6%) ou cafeína (0,04% ou 0,08%) na dieta apresentaram melhor performance (maior índice de discriminação) no teste de reconhecimento de objetos que o grupo controle, na fase teste após 24 horas. Isto demonstra uma melhor retenção da memória de longo prazo pelos animais que consumiram café ou cafeína durante toda vida.

COSTA e colaboradores (2008a) também demonstraram que o tratamento com cafeína aumenta o índice de reconhecimento de objetos comparado ao grupo controle, reforçando seus efeitos positivos na memória de curto e longo prazo. Nesse estudo, a cafeína foi administrada em dose única intraperitoneal (10 mg/kg) durante 4 dias consecutivos. Em outro estudo desse mesmo grupo (COSTA et al., 2008b), a cafeína administrada durante a vida adulta de camundongos preveniu o declínio associado ao envelhecimento na memória de reconhecimento de objetos. Animais idosos tratados com cafeína apresentaram uma performance similar aos animais adultos no reconhecimento de novos objetos. Além disso, a administração de cafeína em animais adultos preveniu o aumento associado ao envelhecimento do conteúdo do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e manteve o conteúdo de receptores de tirosina quinase (TrkB) similar ao encontrado no hipocampo de camundongos adultos. Ou seja, a cafeína preveniu o aumento devido ao envelhecimento do conteúdo de BDNF e TrkB. O BDNF é um dos membros da família das neurotrofinas, essenciais para o crescimento neuronal, sobrevivência e diferenciação celular. As neurotrofinas regulam a sobrevivência das células neuronais e a plasticidade sináptica através da ativação de receptores trkB. Além disso, BDNF também participa da plasticidade dependente de atividade, estando envolvida nos processos de aprendizagem e memória, incluindo a memória de reconhecimento (COSTA et al., 2008a). Recentemente, foi reportado que a adenosina parece participar na sinalização operada por BDNF, já que a adenosina foi capaz de ativar receptores TrkB em neurônios do hipocampo (LEE & CHAO, 2001). Além disso, receptores  $A_{2A}$  parecem ser cruciais para o efeito facilitatório desencadeado pelo BDNF na transmissão sináptica em ratos jovens e idosos (DIÓGENES et al., 2004).

Os resultados obtidos no teste do campo aberto mostraram que a suplementação da dieta com café ou cafeína não teve efeito sobre a atividade exploratória e locomotora dos animais, ou seja, a melhora na performance cognitiva dos animais pela ingestão de café ou cafeína não foi acompanhada de um aumento nas funções sensoriais e motoras dos animais. Além disso, todos os grupos experimentais apresentaram menor atividade exploratória e locomotora no 2º dia (menor número de crossing e rearing), ou seja, todos os grupos apresentaram memória não-associativa intacta. Esses resultados demonstram que a administração de café e cafeína não alterou o nível de ansiedade dos animais. ARENDASH et al. (2006), em um estudo de administração crônica de cafeína (dos 4 aos 8 meses de vida) em camundongos transgênicos usados como modelo para a doença e Alzheimer também obtiveram resultados semelhantes. A cafeína demonstrou uma proteção cognitiva em múltiplos testes que englobam uma variedade de domínios cognitivos, como, memória espacial, memória de trabalho e identificação. Esses benefícios cognitivos da administração de longa duração da cafeína não foram acompanhados de efeitos colaterais significativos nas funções sensoriais e motoras ou no nível de ansiedade que podem ser afetados quando da administração aguda de cafeína.

Nossos resultados estão de acordo com outros estudos (ANGELUCCI et al., 1999; DALL'IGNA et al. 2007; COSTA et al., 2008 a, b) onde a administração crônica de cafeína melhorou a performance cognitiva em animais adultos e idosos. Porém, estudos utilizando o café como alimento funcional, que demonstrem efetivamente a atividade protetora *in vivo*, são escassos na literatura. Alguns mecanismos podem ser sugeridos para o efeito modulador do café sobre o aprendizado e a memória observados nesse estudo. O primeiro seria o de que radicais livres, ao induzirem a morte neuronal, aumentando a perda tecidual, poderiam estar associados com a piora na memória (SCHIMITT-SCHILLIG et al., 2005). Sendo assim, a ingestão diária de café, por possuir efeito protetor sobre o sistema antioxidante endógeno, devido a interações funcionais entre seus diversos componentes, teria como consequência um efeito também benéfico na memória. Outro mecanismo, mais amplamente estudado, diz respeito à ação da cafeína no sistema nervoso central, como antagonista de receptores de adenosina.

Embora o bloqueio de receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  de adenosina ter sido atribuído primeiramente aos efeitos psicoestimulantes da cafeína, estudos recentes têm

mostrado que os efeitos excitatórios e na neuroproteção parecem ser devidos preferencialmente ao bloqueio dos receptores  $A_{2A}$  (DALL'IGNA et al., 2003; HUANG et al., 2005). Apesar da densidade dos receptores de adenosina  $A_{2A}$  ser mais prevalente no estriado, menor densidade no hipocampo não implica menor função no processo de informação (cognição) nessa região cerebral. Nesse cenário, um estudo recente mostrou que a potenciação de longo prazo dependente de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) depende da ativação de receptores de adenosina  $A_{2A}$  pós-sinápticas (REBOLA et al., 2008). Do mesmo modo, a prevenção do declínio cognitivo e a melhora nessa performance pela cafeína em animais são frequentemente reproduzidas por antagonistas seletivos de  $A_{2A}$ , e não por antagonistas de  $A_1$  (CUNHA et al., 2008; PREDIGER et al., 2005).

Como exemplo, podemos citar o estudo de CUNHA et al. (2008) que observaram que antagonistas seletivos dos receptores  $A_{2A}$ , como SCH58261 e KW6002, preveniram a amnésia induzida pela microinjeção cerebral de fragmentos do peptídeo  $\beta$ -amilóide (1-42) em ratos, sem modificar a locomoção espontânea dos animais. Entretanto, o SCH58261 falhou ao prevenir o prejuízo da memória espacial induzida por escopolamina e MK-801, que são drogas que induzem uma piora aguda na memória, seja por induzir um déficit colinérgico, seja por inibir receptores NMDA, que tem um papel central na implementação de diversas formas de plasticidade sináptica no sistema nervoso central de mamíferos.

Esses resultados sugerem que a prevenção da perda de memória pelo bloqueio de receptores de adenosina  $A_{2A}$  não é uma característica geral. Ao contrário, o efeito benéfico resultante do bloqueio dos receptores  $A_{2A}$  somente é observado em condições que levam à perda de memória de maneira lenta e insidiosa, como a provocada pela proteína  $\beta$ -amilóide; e não é observado em condições experimentais que causam uma deterioração aguda da memória, como provocada pela escopolamina ou pelo MK-801. Sendo assim, especula-se que os efeitos benéficos de antagonistas de receptores  $A_{2A}$  nos distúrbios de memória podem estar limitados a condições onde há uma perda lenta da viabilidade sináptica. Essa afirmação implica que receptores  $A_{2A}$  não devem afetar diretamente a farmacologia básica da memória, mas somente indiretamente, controlando a neurodegeneração na perda de memória (CUNHA et al., 2008).

Um possível mecanismo que poderia explicar a capacidade do café e da cafeína na proteção cognitiva e, conseqüentemente, na doença de Alzheimer seria

uma produção reduzida de proteína A $\beta$ -amilóide no cérebro. Os estudos de ARENDASH et al. (2006) mostram que a administração crônica de cafeína em camundongos transgênicos modelos da doença de Alzheimer resultaram em baixos níveis de A $\beta$ -amilóide e protegeram os animais da piora cognitiva. Além disso, diversos autores (PALMER & BURNS, 1994; LOVEL et al., 1999; RINALDI et al., 2003) apontam o estresse oxidativo como um importante fator no início e na progressão da doença de Alzheimer, inclusive com os depósitos de A $\beta$  se co-localizando com diversos marcadores de estresse oxidativo (SMITH et al., 1998).

Sendo assim, diante dos nossos resultados, resolvemos testar a hipótese de que o consumo diário de café levaria a uma produção diminuída de proteína A $\beta$ -amilóide no cérebro, como consequência, entre outros fatores, de uma modulação do sistema antioxidante endógeno por este alimento, levando, assim, a uma proteção cognitiva. Para isto, utilizamos o modelo de indução de diabetes por estreptozotocina, uma vez que foi demonstrado que ratos submetidos à esse modelo apresentam um aumento significativo nos níveis da proteína  $\beta$ -amilóide nos tecidos cerebrais (LIU et al., 2008). Ou seja, esse modelo foi utilizado como uma ferramenta para testarmos o efeito protetor do café na produção de A $\beta$  no cérebro.

A administração de dose única de estreptozotocina (STZ) mostrou-se eficiente em induzir a diabetes nos três diferentes grupos de animais, o que pode ser confirmado pela medida da glicose sanguínea após uma e cinco semanas da injeção com STZ. Os animais diabéticos, controle e suplementados com café ou cafeína, apresentaram uma maior ingestão diária de ração quando comparados com os grupos não diabéticos e uma diminuição da massa corporal, que são sinais clínicos do desenvolvimento da diabetes e estão de acordo com dados da literatura (DUARTE et al., 2009).

Um ponto importante demonstrado por DUARTE e colaboradores (2009) em um estudo dos efeitos da cafeína no hipocampo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, foi que o consumo de cafeína não afetou significativamente os níveis de insulina circulante, sugerindo que o tratamento com cafeína não interfere na ação da STZ. Nossos resultados mostram que a ingestão de café ou cafeína na dieta também não alterou os níveis de glicose sanguínea dos grupos suplementados quando comparados com o grupo controle. Pode-se deduzir, portanto, que os tratamentos com café ou cafeína não interferiram na destruição das células  $\beta$  das

ilhotas de Langerhans do pâncreas, mecanismo pelo qual a STZ induz a diabetes nos animais (JUNOD et al., 1967).

Nossos resultados mostraram que o consumo de café ou cafeína na dieta apontou tendência em diminuir os níveis de A $\beta$ -amilóide, aumentados pela STZ no córtex e no hipocampo dos ratos. Contudo esta tendência pode ser considerada relevante baseando-se nos estudos *in vivo* (DUARTE et al., 2009) e *in vitro* (DALL'IGNA et al 2003) que apoiam o efeito protetor do café no acúmulo de A $\beta$ -amilóide cerebral. Esses últimos demonstraram que a exposição de  $\beta$ -amilóide em culturas de neurônios cerebelares aumentou o número de células não viáveis. A administração de concentrações crescentes de cafeína (1 - 25  $\mu$ M) atenuou e até preveniu completamente a neurotoxicidade induzida pela  $\beta$ -amilóide, aumentando o número de células viáveis. Além disso, o antagonista seletivo de receptores A<sub>2A</sub>, ZM 241385 (50 nM), também bloqueou a neurotoxicidade induzida pela  $\beta$ -amilóide, o que não aconteceu com o antagonista seletivo de receptor A<sub>1</sub> (CPT 200 nM). Sendo assim, os resultados apresentados por DALL'IGNA et al (2003) indicam que a cafeína previne a neurotoxicidade induzida pela  $\beta$ -amilóide em culturas de neurônios cerebelares de ratos e que esse efeito neuroprotetor é provavelmente devido ao bloqueio de receptores de adenosina A<sub>2A</sub>, sugerindo que o bloqueio de receptores A<sub>2A</sub> pode ser um mecanismo geral neuroprotetor.

O estudo de DALL'IGNA et al. (2003) em culturas de células é particularmente instrutivo do ponto de vista de mecanismo porque permite concluir que o bloqueio de receptores A<sub>2A</sub> previne diretamente a morte neuronal, independente de astrócitos, microglia ou elementos vasculares. Recentes evidências indicam que receptores A<sub>2A</sub> são capazes de controlar o ciclo celular em células PC12 (HUANG et al., 2001) e cardiomiócitos (ZHAO et al., 2001) e controlar a entrada de cálcio nos neurônios (GONÇALVES et al., 1997), sendo, portanto, potencialmente capaz de controlar tanto a morte neuronal por apoptose quanto por necrose.

Portanto, diante de comprovados efeitos benéficos da cafeína na diminuição dos níveis de A $\beta$ -amilóide no cérebro, seria interessante aprofundar os estudos dos efeitos da administração crônica de café nesse marcador da doença de Alzheimer, alterando-se alguns parâmetros, como maiores doses/concentrações de café ou utilização de outros modelos de indução do aumento dos níveis de A $\beta$ . A quantidade de café administrada ou o modelo utilizado neste estudo talvez tenham sido os fatores que nos permitiram mostrar somente uma tendência protetora do café, mas

não foram suficientes ou adequados para se demonstrar um efeito protetor significativo do café na diminuição da concentração de A $\beta$ -amilóide no cérebro.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta tese demonstraram que o café exerce função promnésica e antioxidante no sistema nervoso central de ratos, por diminuir a peroxidação de lipídeos das membranas cerebrais, aumentar a concentração de glutathione reduzida e a atividade de diferentes enzimas antioxidantes, além de melhorar a memória de longo prazo dos animais. A cafeína demonstrou ser um importante componente presente no café responsável por esses efeitos, contudo, tendo sua ação modulada pela atividade biológica dos demais compostos do café. Na realidade, pode-se concluir pelo estudo realizado, que o café, devido às interações funcionais entre seus diversos componentes, é um importante alimento funcional, com ação neuroprotetora de modulação do sistema antioxidante cerebral e do aprendizado e memória de ratos adultos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S. K.; SINGH, S.P; KESAVAN, P.C. In vivo antigenotoxic effects of dietary agents and beverages co-administered with urethane: assessment of the role of glutathione S-transferase activity. *Mutat. Res.*, v.413, p. 103–110, 1998.
- ADAMS, S.; GREEN, P.; CLAXTON, R.; SIMCOX, S.; WILLIAMS, M.V.; WALSH, K.; LEEUWENBURGH, C. Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Front. Biosci.*, v. 6, p. 17–24, 2001.
- ALLOUL, K.; SAURIOL, L.; KENNEDY, W.; LAURIER, C.; TESSIER, G.; NOVOSEL, S.; CONTANDRIOPOULOS, A. Alzheimer's disease: a review of the disease, its epidemiology and economic impact. *Arch. Gerontol. Geriatrics*, v.27, p. 189–221, 1998.
- ALMEIDA, A.A.; FARAH, A.; SILVA, D.A.; NUNAN, E.A.; GLÓRIA, M.B. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 8738-8743, 2006.
- AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, p. 7915-7922, 1993.
- ANGELUCCI, M.E.M.; VITAL, M.A.B.F.; CESÁRIO, C.; ZADUSKY, C.R.; ROSALEN, P.L.; DA CUNHA, C. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. *Eur. J. Pharmacol.*, v.373, p. 135-140, 1999.
- ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *J. Vasc. Br.*, v. 3, p. 145-154, 2004.
- ANTONELLI, T.; CARLA, V.; LAMBERTINI, L.; MORONI, F.; BIANCHI, C. Pyroglutamic acid administration modifies the electrocorticogram and increases the release of acetylcholine and GABA from the guinea-pig cerebral cortex. *Pharmacol. Res. Commun.*, v. 16, p. 189-197, 1984.
- ARENDASH, G.W.; SCHLEIF, W.; REZAI-ZADEH, K.; JACKSON, E.K.; ZACHARIA, L.C.; CRACCHIOLO, J.R.; SHIPPY, D.; TAN, J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain  $\beta$ -amyloid production. *Neuroscience*, v. 142, p. 941-952, 2006.

- ABIC (Associação Brasileira da Indústria do Café). Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 28 de agosto de 2009.
- BALDERAS, I.; RODRIGUEZ-ORTIZ, C.J.; SALGADO-TONDA, P.; CHAVEZ-HURTADO, J.; MCGAUGH, J.L.; BERMUDEZ-RATTONI, F. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn. Mem.*, v. 15, p. 618-624, 2008.
- BARNETT, Y. A.; KING, C. M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res.*, v. 338, p. 115-128, 1995.
- BEHL, C.; DAVIS, J.B.; LESLEY, R.; SCHUBERT, D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, v. 77, p. 817–827, 1994.
- BERMUDEZ-RATTONI, F.; OKUDA, S.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Insular córtex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn. Mem.*, v.12, 447-449, 2005.
- BERR, C.; BALANSARD, B.; ARNAUD, J. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillessement Arteriel. *J. Am. Geriatr. Soc.*, v. 48, p. 1285–1291, 2000.
- BERTAINA-ANGLADE, V.; ENJUANES, E.; MORILLON, D.; DRIEU, L.A.; ROCHELLE, C. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 54, p. 99–105, 2006.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr. Campinas*, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BIESSELS, G.J.; KAPPELLA, A.C.; BRAVENBOER, B.; ERKELENS, D.W.; GISPEN, W.H. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia*, v. 37, p. 643–650, 1994.
- BIESSELS, G.J.; KAMAL, A.; RAMAKERS, G.M.; URBAN, I.J.; SPRUIJT, B.M.; ERKELENS, D.W.; GISPEN, W.H. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, v. 45, p.1259-1266, 1996.
- BICHLER, J.; CAVIN, C.; SIMIC, T.; CHAKRABORTY, A.; FERK, F.; HOELZL, C.; SCHULTER-HERMANN, R.; KUNDI, M.; HAIDINGER, G.; ANGELIS, K.; KNASMULLER, S. Coffee consumption protects human lymphocytes against oxidative and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b]indole acetate (Trp-P-2) induced

- DNA-damage: results of an experimental study with human volunteers. *Food Chem. Toxicol.*, v. 45, p. 1428-1436, 2007.
- BLISS T.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond)*, v. 232, p. 331-56, 1973.
- BRANDS, A.M.A.; BIESELS, G.J.; DE HAAN, E.H.F.; KAPPELLE, L.J.; KESSELS, R.P.C. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance. *Diabetes Care*, v. 28, p. 726-735, 2005.
- BRAUNEWELL, K.H.; MANAHAN-VAUGHANS. Long-term depression: a cellular basis for learning? *Rev. Neurosci.*, v. 12, p. 121-140, 2001.
- BREGNARD, A. KUNUSEL, A., KUENZLE, C.C. Are all the neuronal nuclei polyploid?. *Histochem. J.*, v.43, p. 59-61, 1975.
- BRIONI, J.D. Role of GABA during the multiple consolidation of memory. *Drug Develop. Res.*, v. 28, p. 3-27, 1993.
- BUFFALO, E.A.; REBER, P.J.; SQUIRE, L.R. The human perirhinal cortex and recognition memory. *Hippocampus*, v. 8, p. 330–339, 1998.
- BUFFALO, E.A.; BELLGOWAN, P.S.F.; MARTIN, A. Distinct roles for medial temporal lobe structures in memory for objects and their locations. *Learn. Mem.*, v. 13, p. 638-643, 2006.
- BUSSEY, T.J.; MUIR, J.L.; AGGLETON, J.P. Functionally dissociating aspects of event memory: the effects of combined perirhinal and postrhinal cortex lesions on object and place memory in rats. *J. Neurosci.*, v. 19, p. 495-502, 1999.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, v. 250, p. 5475-5480, 1975.
- CAVIN, C.; MACE, K.; OFFORD, E. A; SCHILTER, B. Protective effects of coffee diterpenes against aflatoxin B1-induced genotoxicity: mechanism in rat and human cells. *Food Chem. Toxicol.*, v. 39, p. 549-556, 2001.
- CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W.W.; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem. Toxicol.*, v. 40, p. 1155-1163, 2002.
- CESTARI, V.; CASTELLANO, C. Caffeine and cocaine interaction on memory consolidation in mice. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, v. 331, p. 94–104, 1996.

- CHEN, W.Q.; ZHAO, X.L.; HOU, Y.; LI, S.T.; HONG, Y.; WANG, D.L.; CHENG, Y.Y. Protective effects of green tea polyphenols on cognitive impairments induced by psychological stress in rats. *Behav. Brain Res.*, v. 24, p. 71-76, 2009.
- CHO, E.S.; JANG, Y.J.; HWANG, M.K.; KANG, N.J.; LEE, K.; LEE, H.J. Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals. *Mutat. Res.*, v. 661, p. 18-24, 2009.
- CHONG, Z.Z.; LI, F.; MAIESE, K. Oxidative stress in the brain; novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog. Neurobiol.*, v. 75, p. 207-246, 2005.
- CLARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffee: Chemistry*, 2 ed., London: Elsevier Science Publishers Ltda. 1989.
- CLARKE, R.J. Water e mineral contents. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee chemistry*. v. 1. London: Elsevier Science Publishers Ltda. 1989. p.42-82
- CLEMENTZ, G.L.; DAILEY, J.W. Psychotropic effects of caffeine. *Am. Fam. Physician.*, v. 37, p. 167–172, 1988.
- CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee chemistry*. v. 1. London: Elsevier Science Publishers Ltda. 1989. p.153-202.
- COSTA, M.S.; BOTTON, P.H.; MIORANZZA, S.; ARDIS, A.N.; MOREIRA, J.D.; SOUZA, D.O.; PORCIÚNCULA, L.O. Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunocontent in the hippocampus. *Neurochem. Int.*, v. 53, p. 89-94, 2008a.
- COSTA, M.S.; BOTTON, P.H.; MIORANZZA, S.; SOUZA, D.O.; PORCIUNCULA, L.O. caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tirosine kinase receptor (trkb) content in mice. *Neuroscience*, v. 153, p. 1071-1078, 2008b.
- CUNHA, R.A.; RIBEIRO, J.A. Purinergic modulation of [<sup>3</sup>H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology*, v. 39, p. 1156–1167, 2000.
- CUNHA, G.M.A.; CANAS, P.M.; MELO, C.S.; HOCKEMEYER, J.; MULLER, C.E.; OLIVEIRA, C.R.; CUNHA, R.A. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor blockade prevents memory dysfunction caused by β-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Exp. Neurol.*, v. 210, p. 776-781, 2008.

- DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; DACARRO, C.; GAZZANI, G. Isolation of an antibacterial component from roasted coffee. *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, v. 18, p. 219-225, 1998.
- DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTE, F.; GAZZANI, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 1449-1454, 2000.
- DALL'IGNA, O.P.; PORCIUNCULA, L.O.; SOUZA, D.O.; CUNHA, R.A.; LARA, D.R. Neuroprotection by caffeine and adenosine A<sub>2A</sub> receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br. J. Pharmacol.*, v. 138, p. 1207-1209, 2003.
- DALL'IGNA, O.P.; FETT, P.; GOMES, M.W.; SOUZA, D.O.; CUNHA, R.A.; LARA, D.R. Caffeine and adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists prevent  $\beta$ -amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Experim. Neurol.*, v. 203, p. 241-245, 2007.
- DEMARCHI, M. Café aspectos econômicos. Curitiba: SEAB, Departamento de Economia Rural, 2003. 89 p.
- DEMOUGEOT, C.; VAN HOECKE, M.; BERTRAND, N.; PRIGENT-TESSIER, A.; MOSSIAT, C.; BELEY, A.; MARIE, C. Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,20-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 311, p. 1080-1087, 2004.
- DE MENDONÇA, A.; RIBEIRO, J.A. Adenosine and synaptic plasticity. *Drug Dev. Res.*, v. 52, p. 283-290, 2001.
- DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.*, v. 257, p. 163-173, 1989.
- DEVASAGAYAM, T.P.A.; KAMAT, J.P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P.C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 1282, p. 63-70, 1996.
- DIÓGENES, M.J.; FERNANDES, C.C.; SEBASTIÃO, A.M.; RIBEIRO, J.A. Activation of adenosine A<sub>2A</sub> receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *J. Neurosci.*, v. 24, p. 2905-2913, 2004.
- DROGE, W.; SCHIPPER, H.M. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell*, v. 6, p. 361-370, 2007.
- DUARTE, J.M.N.; CARVALHO, R.A.; CUNHA, R.A.; GRUETTER, R. Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Neurochem.*, v. 111, p. 368-379, 2009.

- DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.*, v. 55, p. 51-86, 2004.
- DUNWIDDIE, T.V.; MASINO, S.A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.*, v. 24, p. 31–55, 2001.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1:Behavioral data. *Behav. Brain Res.*, v. 31, p. 47-59, 1988.
- ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.*, v. 4, p. 1313–1317, 1998.
- FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, v. 18, p. 23-36, 2006.
- FERRARI, C.K.B. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology*, v. 5, p. 275-289, 2004.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Méd. Brasil*, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FISHER, S.; GUILLET, R.; Neonatal caffeine alters passive avoidance retention in rats in an age- and gender-related manner. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, v. 98, p. 145–149, 1997.
- FLOYD, R.A.; CARNEY, J.M. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol.*, v. 32, p. 22–27, 1992.
- FREDHOLM, B.B.; BATTIG, K.; HOLMEN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.*, v. 51, p. 83-133, 1999.
- FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, A.P.; JACOBSON, K.A.; KLOTZ, K.-N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.*, v. 53, p. 527–552, 2001.
- GARDÈS-ALBERT, M.; JORE, D.; FERRADINI, C. Membrane lipid peroxidation: pulse and g-radiolysis in oxyradical research. In Vigo- Pelfrey C (Ed): Membrane lipid oxidation. Santa Clara, CRC Press, 1991. 2-30 p.
- GARRET, B.E.; GRIFFITHS, R.R. The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 5, p. 533-541, 1997.

- GEVAERD, M.S.; TAKAHASHI, R.N.; SILVEIRA, R.; DA CUNHA, C. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. *Brain Res. Bull.*, v. 55, p. 101-106, 2001.
- GILBERT, H.F.; MC LEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, v. 63, p. 69-172, 1990.
- GOMES-PIMENTEL, F. Curso de estatística experimental. 13. ed. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, 1990.
- GONÇALVES, M.L.; CUNHA, R.A.; RIBEIRO, J.A. Adenosine A<sub>2A</sub> receptors facilitate <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake through class A calcium channels in rat hippocampal CA3 but not CA1 synaptosomes. *Neurosci. Lett.*, v. 238, p. 73-77, 1997.
- GOULD, E.; MCEWEN, B.S.; TANAPAT, P.; GALEA, L.A.; FUCHS, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.*, v.17, p.2492–2498, 1997.
- GRIOLI, S.; LOMEO, C.; QUATTROPANI, M.C.; SPIGNOLI, G.; VILLARDITA, C. Pyroglutamic acid improves the age associated memory impairment. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, v. 4, p. 169-173, 1990.
- GROSS, G.; JACCAUD, E.; HUGGETT, A.C. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. *Food Chem. Toxicol.*, v. 35, p. 547-554, 1997.
- GUPTA, A.; HASAN, M.; CHANDER, R.; KAPOOR, N.K. Age-related elevation of lipid peroxidation products: diminution of superoxide dismutase activity in the central nervous system of rats. *Gerontology*, v. 37, p. 305–309, 1991.
- GUZMAN-MARIN, R.; SUNTSOVA, N.; METHIPPARA, M.; GREIFFENSTEIN, R.; SZYMUSIAK, R.; MCGINTY, D. Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur. J. Neurosci.*, v.22, p.2111–2116, 2005.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione-S-transferase. The first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, v. 249, p. 7130-7139, 1974.
- HACK, V.; BREITKREUTZ, R.; KINSCHERF, R.; RÖHRER, H.; BARTSCH, P.; TAUT, F.; BENNER, A.; DRÖGE, W. The redox state as a correlate of senescence and wasting and as a target for therapeutic intervention. *Blood*, v. 92, p. 59–67, 1998.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, v. 186, p. 1-85, 1990.
- HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, v. 2, p. 298–300, 1957.

- HARRISON, F.E.; HOSSEINI, A.H.; DAWES, S.M.; WEAVER, S.; MAY, J.M. Ascorbic acid attenuates scopolamine-induced spatial learning deficits in the water maze. *Behav. Brain Res.*, v. 205, p. 550-558, 2009.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, v. 48, p. 422-427, 1972.
- HASKELL, C.F.; KENNEDY, D.O.; WESNES, K.A.; SCHOLEY, A.B. Cognitive and mood improvements of caffeine in habitual consumers and habitual non-consumers of caffeine. *Psychopharmacology*, v. 179, p. 813-825, 2005.
- HAYES, J.D.; FLANAGAN J.U.; JOWSEY I.R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 45, p. 51-88, 2005.
- HEBB, D.O. The organization of behavior. New York: Wiley, 1949.
- HELDT, S.A.; STANEK, L.; CHHATWAL, J.P.; RESSLER, K.J. Hippocampus specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol. Psychiatry*, v.12, p. 656–670, 2007.
- HERRAIZ, T.; CHAPARRO, C. Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and beta-carbolines norharman and harman isolated from coffee. *Life Sci.*, v. 78, p. 795-802, 2006.
- HUANG, N.K.; LIN, Y.W.; HUANG, C.L.; MESSING, R.O.; CHERN, Y. Activation of protein kinase A and atypical protein kinase C by  $A_{2A}$  adenosine receptors antagonizes apoptosis due to serum deprivation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 13838-13846, 2001.
- HUANG, Z.L.; QU, W.M.; EGUCHI, N.; CHEN, J.F.; SCHWARZSCHILD, M.A.; FREDHOLM, B.B.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Adenosine  $A_{2A}$ , but not  $A_1$ , receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat. Neurosci.*, v.8, p.858–859, 2005.
- HUBER, W.W.; MCDANIEL, L.P.; KADERLIK, K.R.; TEITEL, C.H.; LANG, N.P.; KADLUBAR, F.F. Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5b)pyridine (PhIP) in the rat. *Mutat. Res.*, v. 376, p. 115-122, 1997.
- HUBER, W.W.; PRUSTOMERSKY, S.; DELBANCO, E.; UHL, M.; SCHARF, G.; TURESKY, R. J.; THIER, R.; SCHULTE-HERMANN, R. Enhancement of the chemoprotective enzymes glucuronosyl transferase and glutathione transferase in specific organs of the rat by the coffee components kahweol and cafestol. *Arch. Toxicol.*, v. 76, p. 209-217, 2002.

- HUBER, W.W.; SCHARF, G.; NAGEL, G.; PRUSTOMERSKY, S.; SCHULTE-HERMANN, R. KAINA, B. Coffee and its chemopreventive components kahweol and cafestol increase the activity of O-metilguanina-DNA metiltransferase in rat liver-comparison with phase II xenobiotic metabolism. *Mutat. Res.*, v. 522, p. 57-68, 2003.
- HWANG, Y.P.; JEONG, H.G. The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamina-derived oxidative stress. *FEBS Lett.*, v. 582, p. 2655-2662, 2008.
- IGAZ, L.M.; VIANNA, M.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Two time periods of hippocampal RNA synthesis are required for memory consolidation of fearmotivated learning. *J. Neurosci.*, v. 22, p. 6781-6789, 2002.
- ICO (International Coffee Organization). A história do café. Disponível em: <<http://www.ico.org>>. Acesso em: 28 de agosto de 2009.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; VIANNA, M.R.M.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.*, v. 103, p. 1-11, 1999.
- IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav. Pharmacol.*, v. 11, p. 517-534, 2000.
- IZQUIERDO, I. Memória. São Paulo: Artmed, 2002.
- IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; MEDINA, J.H.; BEVILAQUA, L.R.M. Pharmacological findings on the biochemical bases of memory processes: a general view. *Neural Plast*, v. 11, p. 1-31, 2004.
- IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.M.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.*, v. 29, p. 496-505, 2006.
- JELLINGER, K.A. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J. Neural. Transm.*, v. 116, p. 1111-1162, 2009.
- JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A.E. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 126, p. 201-205, 1967.
- KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. (Ed.) Princípios da Neurociência. São Paulo: Manole, 2003. 1227 p.

- KELLER, J.N.; LAUDERBACK, C.M.; BUTTERFIELD, D.A.; KINDY, M.S.; YU, J.; MARKESBERY, W.R. Amyloid beta-peptide effects on synaptosomes from apolipoprotein E-deficient mice. *J. Neurochem.*, v. 74, p. 1579–1586, 2000.
- KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, v. 386, p. 493–495, 1997.
- KITTNER, B.; ROSSNER, M.; ROTHER, M. Clinical trials in dementia with propentofylline. *Ann. New York Acad. Sci.*, v. 826, p. 307–316, 1997.
- KREMER, J.J.; SKLANSKY, D.J.; MURPHY, R.M. Profile of changes in lipid bilayer structure caused by beta-amyloid peptide. *Biochemistry*, v. 40, p. 8563–8571, 2001.
- KUHN, H.G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.*, v.16, p.2027–2033, 1996.
- LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin. Chim. Acta*, v. 295, p.141–154, 2000.
- LEE, F.S.; CHAO, M.V. Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 98, p. 3555–3560, 2001.
- LEE, K.J.; JEONG, H.G. Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. *Toxicol. Letters*, v.173, p. 80-87, 2007.
- LEE, W.J.; ZHU, B.T. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis*, v. 27, p. 269-277, 2006.
- LIU, R.; LIU, I.Y.; BI, X.; THOMPSON, R.F.; DOCTROW, S.R.; MALFROY, B.; BAUDRY, M. Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 100, p. 8526–8531, 2003.
- LIU, Y.; LIU, H.; YANG, J.; LIU, X.; LU, S.; WEN, T.; XIE, L.; WANG, G. Increased amyloid  $\beta$ -peptide (1-40) level in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience*, v. 153, p. 796-802, 2008.
- LOVELL, M.A.; GABBITA, S.P.; MARKESBERY, W.R. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J. Neurochem.*, v. 72, p. 771–776, 1999.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAESO, N.; DEL CASTILLO, C.; CORNEJO, L.; GARCIA-ACICOLLAR, M.; ALGUACIL, L.F.; BARBAS, C. Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees. Study of the in vivo effect on learning and locomotor activity in mice. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 41, p. 1095-1100, 2006.
- MACCIONI, R.B.; MUÑOZ, J.P.; BARBEITO, L. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Arch. Med. Res.*, v. 32, p. 367-381, 2001.
- MAIA L.; DE MENDONÇA, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur. J. Neurol.*, v.9, p. 377–382, 2002.
- MAIESE, K. Organic brain disease. In: Ramachandran, V.S. (Ed.) *Encyclopedia of the Human Brain*. Elsevier Science, 2002. 509– 527 p.
- MAJER, B.J.; HOFER, E.; CAVIN, C.; LHOSTE, E.; UHL, M.; GLATT, H.R.; MEINL, W.; KNASMÜLLER, S. Coffee diterpenes prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N nitrosodimethyl amine in a human derived liver cell line (HepG2). *Food Chem. Toxicol.*, v. 43, p. 433-441, 2005.
- MALBERG, J.E.; EISCH, A.J.; NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, v. 20, p. 9104–9110, 2000.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, v. 47, p. 469-474, 1974.
- MATÉS, J.M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci.*, v. 4, p. 339-345, 1999.
- MATTHIES, H. In search of the cellular mechanisms of memory. *Prog. Neurobiol.*, v. 132, p. 277-349, 1989.
- MAZZAFERA, P. Trigonelline in coffee. *Phytochem.*, v. 30, p. 2309-2310, 1991.
- MCGAUGH, J.L. Memory – a century of consolidation. *Science*, v. 287, p. 248-251, 2000.

- MCGRATH, L.T.; MCGLEENON, B.M.; BRENNAN, S.; MCCOLL, D.; MC, I.S.; PASSMORE, A.P. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *Q.J.M.*, v. 94, p. 485–490, 2001.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 52, p. 711-760, 1983.
- MELLO FILHO A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.*, v. 218, p. 273-275, 1983.
- MILNER, B. SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, v. 20, p. 445-468, 1998.
- MONJI, A.; UTSUMI, H.; UEDA, T.; IMOTO, T.; YOSHIDA, I.; HASHIOKA, S.; TASHIRO, K.; TASHIRO, N. The relationship between the aggregational state of the amyloid-beta peptides and free radical generation by the peptides. *J. Neurochem.*, v. 77, p. 1425–1432, 2001.
- MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim. Nova*, v. 28, p. 637-641, 2005.
- MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. Componentes voláteis do café torrado, parte II, compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. *Quim. Nova*, v. 23, p. 195-203, 2000.
- MORI, H.; KAWABATA, K.; MATSUNAGA, K.; USHIDA, J.; FUJII, K.; HARA, A.; TANAKA, T.; MURAI, H. Chemopreventive effects of coffee bean and rice constituents on colorectal carcinogenesis. *Biofactors*, v. 12, p. 101-105, 2000.
- MORTON, S.; MITCHELL, M.C. Effects of chronic ethanol feeding on glutathione turnover in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, v. 34, p. 1559-1563, 1985.
- MUKHERJEE, P.K.; MARCHESELLI, V.L.; SERHAN, C.N.; BAZAN, N.G. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 101, p. 8491–8496, 2004.
- NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5735-574, 2002.
- NATELLA, F.; NARDINI, M.; GIANNETTI, I.; DATTILO, C.; SCACCINI, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 6211-6216, 2002.

- NEHLIG, A.; DAVAL, J.L.; DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: Mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, v. 17, p. 139–170, 1992.
- NEVE, D.L.; MCPHIE, Y.C. Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res.*, v. 54, p. 886-897, 2000.
- NOSCHANG, C.G.; KROLOW, R.; PETTENUZZO, L.F.; ÁVILA, M.C.; FACHIN, A.; ARCEGO, D.; TOIGO, E.V.P.; CREMA, L.M.; DIEHL, L.A.; VENDITE, D.; DALMAZ, C. Interactions Between Chronic Stress and Chronic Consumption of Caffeine on the Enzymatic Antioxidant System. *Neurochem. Res.*, v. 34, p. 1568-1574, 2009.
- OLIVEIRA, J.E.D.; MARCHINI, J.S. Ciências Nutricionais – aprendendo a aprender. São Paulo: Sarvier, 2008.
- OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Human Nutrition and Metabolism. *J. Nutr.*, v. 131, p. 66-71, 2001.
- PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 70, p. 158-169, 1967.
- PALMER, A.M.; BURNS, M.A. Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res.*, v. 645, p. 338–342, 1994.
- PALMER, T.D.; WILLHOITE, A.R.; GAGE, F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.*, v. 425, p. 479–494, 2000.
- PAOLINELLI, S.T. Ação da cúrcuma como alimento funcional sobre o sistema de biotransformação de xenobióticos induzidos pela desnutrição. 2002. 73 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2002.
- PAPADELIS, C.; KOURTIDOU-PAPADELI, C.; VLACHOGIANNIS, E.; SKEPASTIANOS, P.; BAMIDIS, P.; MAGLAVERAS, N.; PAPPAS, K. Effects of mental workload and caffeine on catecholamines and blood pressure compared to performance variations. *Brain and Cogn.*, v. 51, p.143-154, 2003.
- PEREIRA, G.S. Sistema adenosinérgico em diferentes paradigmas comportamentais. 2005. (Tese, Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.
- PEREIRA, G.S.; ROSSATO, J.I.; SARKIS, J.J.F.; CAMMAROTA, M.; BONAN, C.D.; IZQUIERDO, I. Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex

- impairs memory retrieval in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.*, v. 83, p. 217-223, 2005.
- PETTIGREW, J. *Café*. São Paulo:Nobel, 1999. 96 p.
- POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, v. 67, p. 289-297, 1997.
- PRASAD, M.A.M.; DUMOUCHELLE, E.; KONIUCH, D.; OBERLEAS, D. A simple fluorometric assay for the determination of RNA and DNA in tissues. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 80, p. 598-601, 1972.
- PREDIGER, R.D.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R.N. Blockade of adenosine A<sub>2A</sub> receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav. Brain Res.*, v. 159, p. 197-205, 2005.
- REBOLA, N.; LUJAN, R.; CUNHA, R.A.; MULLE, C. Adenosine A<sub>2A</sub> receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, v. 57, p. 121–134, 2008.
- RIEDEL, W.; HOGERVORST, E.; LÉBOUX, R.; VERHEY, F.; VAN PRAAG, H.; JOLLES, J. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 122, p. 158–168, 1995.
- RIBEIRO, J.A.; SEBASTIÃO, A.M.; DE MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.*, v. 68, p. 377-392, 2003.
- RINALDI, P.; POLIDORI, M.C.; METASSTASIO, A. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, v. 24, p. 915–919, 2003.
- RITCHIE, K.; CARRIERE, I.; DE MENDONÇA, A.; PORTET, F.; DARTIGUES, J.F.; ROUAUD, O.; BARBERGER-GATEAU, P.; ANCELIN, M.L. The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology*, v.69, p.536–545, 2007.
- ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.; MYSKIW, J.C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn. Mem.*, v. 14, p. 36-46, 2007.
- SAKAMAKI, K. Regulation of endothelial cell death and its role in angiogenesis and vascular regression. *Curr. Neurovasc. Res.*, v. 1, p. 305–315, 2004.

- SCHMITT-SCHILLIG, S.; SCHAFFER, S.; WEBER, C.C.; ECKERT, G.P.; MULLER, W.E. Flavonoids and the aging brain. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 56, p. 23-36, 2005.
- SEBASTIÃO, A.M.; RIBEIRO, J.A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 21, p. 341–346, 2000.
- SERRANO, F.; KLANN, E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Aging Res. Rev.*, v. 3, p. 431–443, 2004.
- SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther.*, v. 47, p. 61-71, 1990.
- SHI, X.; DALAL, N.S.; JAIN, A.C. Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem. Toxicol.*, v. 29, p. 1–6, 1991.
- SHORS, T.J.; MIESEGAES, G.; BEYLIN, A.; ZHAO, M.; RYDEL, T.; GOULD, E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, v. 410, p. 372–376, 2001.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *Eur. J. Biochem.*, v. 215, p. 213-219, 1993.
- SILVA, A.J.; ELGERSMA, Y.; COSTA, R.M. Molecular and cellular mechanisms of cognitive function: implications for psychiatric disorders. *Biol. Psych.*, v. 47, p. 200-209, 2000.
- SIQUEIRA, I.R.; FOCHESSATTO, C.; LUCENA DA SILVA TORRES, I.; DALMAZ, C.; NETTO, C.A. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. *Life Sci.*, v. 78, p. 271–278, 2005.
- SINDICAFÉ (Sindicato da Indústria de Café de São Paulo). Disponível em: <http://www.sindicafesp.com.br>. Acesso em 29 de agosto de 2009.
- SMITH, A.W. Introduction. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee chemistry*, v. 1. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 1-41.
- SMITH, A.; MABEN, A.; BROCKMAN, P. Effects of evening meals and caffeine on cognitive performance, mood and cardiovascular functioning. *Appetite*, v. 22, p. 57–65, 1994.
- SMITH, M.A.; HIRAI, K.; HSIAO, K.; PAPPOLLA, M.A.; HARRIS, P.L.; SIEDLAK, S.L.; TABATON, M.; PERRY, G. Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J. Neurochem.*, v. 70, p. 2212–2215, 1998.
- SMITH, A.; BRICE, C.; NASH, J.; RICH, N.; NUTT, D.J. Caffeine and central noradrenaline: effects on mood, cognitive performance, eye movements and cardiovascular function. *J. Psychopharm.*, v.17, p.283-292, 2003.

- SQUIRE, L.R.; ZOLA-MORGAN, S. The medial temporal lobe memory system. *Science*, v. 253, p. 1380–1386, 1991.
- STADLER, R. H.; TURESKY, R. J.; MULLER, O.; MARKOVIE, J.; LEONG-MORGENTHALER, P. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat. Res.*, v. 308, p. 177-190, 1994.
- STANTON, P.K. LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus*, v. 6, p. 35-42, 1996.
- STRITTMATTER, W.J.; SAUNDERS, A.M.; SCHMECHEL, D.; PERICAK-VANCE, M.; ENGHILD, J.; SALVESEN, G.S.; ROSES, A.D. Apolipoprotein E: high-avidity binding to b-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, p. 1977–1981, 1993.
- SUBRAMANIAN, R.; KOPPAL, T.; GREEN, M.; YATIN, S.; JORDAN, B.; DRAKE, J.; BUTTERFIELD, D.A. The free radical antioxidant Vitamin E protects cortical synaptosomal membranes from amyloid beta-peptide(25–35) toxicity but not from hydroxynonenal toxicity: relevance to the free radical hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.*, v. 23, p. 1403– 1410, 1998.
- TIETZE, F. Enzymic method of quantitative determination of nanogram amount of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.*, v. 27, p. 502-525, 1969.
- TRUGO, L.C.; MACRAE, R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.*, v. 15, p. 219-228, 1984.
- TSUDA, T.; CHI H.; LIANG, Y.; ROGAEVA, E.A.; SHERRINGTON, R.; LEVESQUE, G.; IKEDA, M.; ROGAEV, E.I.; POLLEN, D.; FREEDMAN, M. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, v.375, p. 754–760, 1995.
- TULVING, E.; SCHACTER, D.L. Priming and human memory systems. *Science*, v. 247, p. 301-306, 1990.
- TUN, P.A.; NATHAN, D.M.; PERLMUTER, L.C. Cognitive and affective disorders in elderly diabetics. *Clin. Geriatr. Med.*, v. 6, p. 731–746, 1990.
- TURESKY, R. J.; RICHOSZ J.; CONSTABLE, A.; CURTIS, K. D.; DINGLEY, K. H.; TURTELTAUB, K. W. The effects of coffee on enzymes involved in metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine in rats. *Chem. Biol. Interact.*, v. 145, p. 251-265, 2003.

- URGERT, R.; SCHULZ A.G.M.; KATAN, M.B. Separate effects of the coffee diterpenes cafestol and kahweol on serum lipids and liver aminotransferases. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 65, p.519-524,1997.
- VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.*, v. 2, p. 266–270, 1999.
- VARADARAJAN, S.; YATIN, S.; KANSKI, J.; JAHANSHAH, F.; BUTTERFIELD, D.A. Methionine residue 35 is important in amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Brain Res. Bull.*, v. 50, p. 133–141, 1999.
- VITORINO, M.D.; FRANÇA, A.S.; OLIVEIRA, L.S; BORGES, M.L.A. Metodologia de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis. *Revista Brasileira de Armazenamento*, v. especial Café, n.3, p.17-24, 2001.
- XIAO, X.Q.; LIU, G.Q. L-pyroglutamic acid protects rat cortical neurons against sodium glutamate-induced injury. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, v. 20, p. 733-736, 1999.
- WANG, Y.; WU, J.; ROWAN, M.J.; ANWYL, R. Conditions for the induction of long-term potentiation and long-term depression by conjunctive pairing in the dentate gyrus in vitro. *J. Neurophysiol.*, v. 78, p. 2569-2573, 1997.
- WENTZ, C.T.; MAGAVI, S.S. Caffeine alters proliferation of neuronal precursors in the adult hippocampus. *Neuropharmacology.*, v. 56, p. 994-1000, 2009.
- WHITLOCK, J.R.; HEYNEN, A.J.; SHULER, M.G.; BEAR, M.F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, v. 1093, p. 1093-1097, 2006.
- WINTERS, B.D.; FORWOOD, S.E.; COWELL, R.A., SAKSIDA, L.M.; BUSSEY, T.J. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J. Neurosci.*, v. 24, p. 5901-5908, 2004.
- WINTERS, B.D.; SAKSIDA, L.M.; BUSSEY, T.J. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 32, p. 1055-1070, 2008.
- YAGI, K. Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol.*, v. 105, p. 328-331, 1984.
- YAMAMOTO, T.; MARUYAMA, W.; KATO, Y.; YI, H.; SHAMOTO-NAGAI, M.; TANAKA, M.; SATO, Y.; NAOI, M. Selective nitration of mitochondrial complex I by

- peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J. Neural. Transm.*, v. 109, p. 1–13, 2002.
- YAMATO, T.; YAMASAKI, S.; MISUMI, Y.; KINO, M.; OBATA, T.; AOMINE, M. Modulation of the stress response by coffee: an in vivo microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat. *Neurosc. Letters*, v.332, p.87-90, 2002.
- ZHAO, Z.Q.; BUDDE, J.M.; MORRIS, C.; WANG, N.P.; VELEZ, D.A.; MURAKI, S.; GUYTON, R.A.; VINTEN-JOHANSEN, J. Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 33, p. 57- 68, 2001.
- ZHU, Y.; CARVEY, P.M.; LING, Z. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. *Brain Res.*, v. 1090, p. 35–44, 2006.
- ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L.R.; AMARAL, D.G.; SUZUKI, W.A. Lesions of perirhinal and parahippocampal cortex that spare the amygdala and hippocampal formation produce severe memory impairment. *J. Neurosci.*, v. 9, p.4355–4370, 1989.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)