

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
KELLER MIRANDA MINATTO**

**ESTUDO DO EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE NÍVEIS DE ANSIEDADE  
E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS  
TREINADOS EM PISCINA**

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**KELLER MIRANDA MINATTO**

**ESTUDO DO EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE NÍVEIS DE ANSIEDADE  
E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS  
TREINADOS EM PISCINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde.

Orientadora: Carina Rodrigues Boeck

Co-orientador: Ricardo Aurino Pinho

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2009**

Dedico este trabalho à minha mãe Rosiléa Miranda Minatto, por todos os cuidados, desde minha vida embrionária e sua inabalável confiança em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Na evolução deste trabalho, muitas pessoas contribuíram de forma única e importante, mas gostaria de agradecer às seguintes pessoas pelas suas contribuições a minha pessoa e ao trabalho desenvolvido: Professora orientadora Dra. Carina Rodrigues Boeck, grande incentivadora desta pesquisa e pela condução do trabalho nestes dois anos e o Professor co-orientador Dr. Ricardo Aurino de Pinho por ter me auxiliado e incentivado a dar os primeiros passos no egresso ao mestrado.

Meus familiares em especial, meus pais Valmir e Rosiléa, meu irmão Peter, minha irmã, Letícia, pelo companheirismo, amizade, confiança, respeito e por sempre me apoiarem.

A minha noiva, amiga e companheira Juliana que está ao meu lado nesta nova conquista e pela compreensão nos momentos de angústia.

As novas amizades conquistadas que muito acrescentaram para minha vida pessoal e profissional.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

Obrigado a todos!

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.” (São Francisco de Assis)

## RESUMO

Os exercícios físicos aplicados como programa de treinamento progressivo controlado podem ser considerados importantes instrumentos de prevenção de doenças, auxiliar na promoção da saúde e no tratamento de algumas patologias crônico-degenerativas. Visando promover o sucesso de esportistas, profissionais da área da saúde têm buscado recursos para potencializar o desempenho atlético ou reprimir os mecanismos geradores de fadiga, nesse sentido, a utilização de suplementos nutricionais, como a cafeína, tem se mostrado eficiente. A cafeína é a substância psicoativa mais consumida no mundo, na forma de bebidas como café, chás, refrigerantes a base de cola e alimentos como o chocolate. O presente estudo tem como objetivo elucidar os efeitos da cafeína e do exercício físico sobre os níveis de ansiedade, de danos oxidativos a proteínas e lipídeos nas regiões cerebrais estriado e córtex pré-frontal de camundongos submetidos a treinamento físico em piscina de intensidade moderada. Avalia-se também a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no estriado e córtex pré-frontal dos animais. Para tanto, foram utilizados camundongos machos adultos que foram expostos a treinamento progressivo de natação durante oito semanas. Sessenta animais foram divididos em quatro grupos: nT-controle = animais não treinados na piscina (n = 15); nT-caf = animais não treinados na piscina que receberam cafeína da dose de 0,3 g/L durante o treinamento (n=15); T-controle = animais treinados na piscina (n = 15); T-caf = animais treinados na piscina que receberam cafeína durante o treinamento. Após o cumprimento do programa de exercícios, foi realizado teste comportamental através do Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus-Maze*), para que se pudesse avaliar a interferência da cafeína nos níveis de ansiedade dos animais expostos ao estresse por exercício físico. Após a análise dos dados pode-se observar que a cafeína agiu sobre o estresse provocado pelo exercício físico, diminuindo os níveis de ansiedade nos animais testados, reproduzindo o efeito de fármacos ansiolíticos. Com relação aos danos a biomoléculas, observou-se nas estruturas cerebrais estudadas significativo aumento na formação de grupos carbonil em proteínas do estriado proveniente dos animais treinados e tratados com cafeína. Observamos aumento na peroxidação de lipídeos no córtex pré-frontal dos animais treinados com ou sem tratamento com cafeína. Com relação à atividade das enzimas antioxidantes, a cafeína ativou a SOD no estriado e a CAT no córtex pré-frontal. Outros estudos demonstram que a cafeína pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, entretanto no presente estudo se observou alterações de baixa relevância nas estruturas cerebrais estudadas, provavelmente devido a adaptação das células nervosas ao estímulo estressor do treinamento.

**Palavras-chave:** Cafeína; Exercício Físico; Ansiedade; Estresse Oxidativo.

## ABSTRACT

The progressive physical exercises in controlled training program can be considered an important preventive against disease, useful for health promotion and in the treatment of some chronic degenerative diseases. In order to promote the success of athletes, professionals have search method to enhance athletic performance or to diminish the mechanisms that promote fatigue. Thus, the use of nutritional supplements such as caffeine, have been proven to be effective to better performance. Caffeine is one the most widely consumed psychoactive substance in the world, in the form of beverages such as coffee, tea, soft drinks, the cola and foods like chocolate. The present study aims to elucidate the effects of caffeine and physical exercise on anxiety levels and oxidative damage to proteins and lipids from brain regions, striatum and prefrontal cortex, of mice subjected to physical training in a moderate intensity protocol. It also was evaluated the activity of antioxidant enzymes, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). Thus, adult male CF-1 mice (3 months old) were exposed to progressive training swimming for eight weeks. Sixty animals were divided into four groups: nT-control = animals non-trained (n = 15); nT-caf non-trained animals treated with caffeine (0.3g/L) in water bottle during the training (n = 15); T-control = animals trained (n = 15; T-caf = animals trained treated with caffeine during the training. Twenty four hours after the last day of training, the anxiety-like behavior of mice were evaluated in Elevated Plus-Maze. Just after behavioral analysis the mice were decapitate to prepared cerebral samples to measure oxidative stress. The data showed that caffeine prevented the reduced anxiety levels induced by training, reproducing the effect of anxiolytic drugs. Regarding to damage to biomolecules, it was observed in brain structures studied significant change in the formation of carbonyl groups in striatal proteins from animals treated with caffeine. Also, it was observed increase in lipid peroxidation in the prefrontal cortex of trained animals treated with caffeine. The activity of antioxidant enzymes, were activated by caffeine in the striatum and prefrontal cortex. Other studies show that caffeine can increase the activity of antioxidant enzymes, however in present study was not observe significant alterations, probably due to adaptation of the neural cells to the stressor stimulus of the training.

**Keywords:** Caffeine; Exercise; Oxidative Stress; Anxiety.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química da cafeína e metilxantinas relacionadas. ....	17
Figura 2: Labirinto em Cruz elevada para Camundongos .....	30
Figura 3: Efeito do treinamento físico de oito semanas e da administração crônica de cafeína sobre o tempo gasto nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado. ....	37
Figura 4: Efeito do treinamento físico de oito semanas e da administração crônica de cafeína sobre dano de proteínas e lipídeos no estriado de camundongos. ....	38
Figura 5: Efeito do treinamento físico de oito semanas e da administração crônica de cafeína sobre dano de proteínas e lipídeos no córtex pré-frontal de camundongos. ....	39
Figura 6: Efeito do treinamento físico de oito semanas e da administração crônica de cafeína sobre a atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) no estriado de camundongos. ....	40
Figura 7: Efeito do treinamento físico de oito semanas e da administração crônica de cafeína sobre a atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) no córtex pré-frontal de camundongos. ....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais fontes de cafeína na dieta.....	15
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A<sub>1</sub> – Adenosina

A<sub>2A</sub> – Receptor de adenosina do tipo A<sub>2A</sub>

A<sub>2B</sub> – Receptor de adenosina do tipo A<sub>2B</sub>

A<sub>3</sub> – Receptor de adenosina do tipo A<sub>3</sub>

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

AMP-c - adenosina monofosfato-cíclico

ATP - Adenosina Trifosfato

DA – Dopamina

FDA - *Food and Drug Administration*

RLs – Radicais livres

SOD - superóxido dismutases (CuZn-SOD; Mn-SOD)

CAT - Catalase

GPX - glutationa peroxidase

Eros – espécies reativas ao oxigênio

XO - xantina oxidase

PNM - neutrófilos polimórfos

NAPH – nicotinamida dinucleotídeo fosfato

SNC - Sistema Nervoso Central

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 Fisiologia do exercício.....	12
1.2 Exercício físico e consumo de cafeína.....	13
1.3 Ação farmacológica da cafeína.....	15
1.4 Efeito da Cafeína sobre a Ansiedade.....	18
1.5 Estresse oxidativo e exercício físico.....	19
1.5.1 Superóxido dismutase (SOD).....	23
1.5.2 Catalase (CAT).....	24
1.6 Cafeína, estresse oxidativo e exercício físico .....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	27
2.1 Objetivo geral .....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
3.1 Animais experimentais e tratamento.....	28
3.2 Protocolo de treinamento .....	29
3.3 Teste comportamental no Labirinto em cruz elevado (Elevated Plus-Maze) .....	29
3.4 Medidas de estresse oxidativo.....	30
3.4.1 Danos oxidativos à biomoléculas.....	31
3.4.1.2 Carbonilação de proteínas .....	31
3.4.1.3 Formação de sulfidrilas .....	32
3.4.1.4 Xilenol laranja .....	32
3.4.2 Atividade de enzimas antioxidantes .....	33

<b>3.4.2.1 Catalase (CAT)</b> .....	33
<b>3.4.2.2 Superóxido dismutase (SOD)</b> .....	33
<b>3.4.2.3 Determinação da proteína</b> .....	34
<b>3.5 Análise estatística</b> .....	35
<b>4 RESULTADOS</b> .....	36
<b>4.1 Teste comportamental</b> .....	36
<b>4.1.2 Dano oxidativo a biomoléculas e atividade enzimática</b> .....	37
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Fisiologia do exercício

O presente estudo aborda o tema efeito da cafeína e a interação com níveis de ansiedade sobre parâmetros de estresse oxidativo associado à prática de exercício físico progressivo moderado em camundongos. Afeto às Ciências da Saúde, o assunto tem importância reconhecidamente destacada junto à neurologia, à educação física, à nutrição e à fisioterapia, por exemplo.

Nesse norte, sabe-se que a prescrição de exercícios físicos aplicados na forma de programa de treinamento progressivo controlado pode ser considerado um importante instrumento de prevenção de doenças, de promoção da saúde e auxiliar no tratamento de algumas patologias crônico-degenerativas, conforme afirmam Makrilakis & Katsilambros (2003), Miche et al. (2006), Sengupta & Maji (2005); Jimenez (1997) sobre o Diabetes Mellitus; Hennessy et al. (2005), Swenson et al. (2005) a respeito de doenças como o câncer de cólon e reto; Mazzeo & Tanaka (2001), quanto à hipertensão arterial; ou Ernest et al. (2006) e Duman (2005), sobre depressão.

Não obstante, estudos realizados por Cote (2006), Carlsson et al. (2006), Klieman et al. (2006), Cooper et al. (2006) e Chan et al. (2006) demonstram que a atividade física está relacionada a menores índices de mortalidade.

Nessa perspectiva, também há estudos indicando que o exercício físico favorece a integridade cerebrovascular, o aumento do transporte de oxigênio para o cérebro, a síntese e degradação de neurotransmissores, a diminuição da pressão arterial, dos níveis de colesterol e dos triglicerídeos. Como ainda, contribui à inibição

da agregação plaquetária, aumento da capacidade funcional e, conseqüentemente, à melhoria da qualidade de vida e do desempenho físico do indivíduo praticante (Mcauley & Rudolph, 1995).

Ainda com relação aos benefícios que o exercício físico apresenta à saúde, pode-se dizer que está intimamente associado ao aumento na capacidade aeróbia e à melhora de algumas funções cognitivas, como a memória, a atenção, o raciocínio e da praxia (Boxtel et al., 1997). A melhora da função cognitiva em resposta ao exercício físico pode estar relacionada a fatores como alterações nos níveis de hormônios (catecolaminas, ACTH e vasopressina),  $\beta$ -endorfinas, serotonina (Santos et al., 1998).

## **1.2 Exercício físico e consumo de cafeína**

Sob outra ótica, tem-se que, visando promover o sucesso de esportistas, profissionais da área da saúde têm buscado recursos para potencializar o desempenho atlético ou reprimir os mecanismos geradores de fadiga.

Nesse sentido, a utilização de suplementos nutricionais, como a cafeína, têm se mostrado eficiente porque retarda o aparecimento da fadiga (Davis et al., 2003) e aumenta o poder contrátil do músculo esquelético e cardíaco, aprimorando, desse modo, a capacidade de realizar o trabalho físico (Gomes & Tirapegui, 2000).

Embora significativa parcela dos estudos não seja conclusiva quanto aos mecanismos responsáveis pelos efeitos da cafeína no metabolismo durante a atividade física, há evidências de que outros mecanismos possam estar associados à ação desse fármaco durante a execução de diferentes tipos de exercícios. Por esse caminho, os achados até o presente momento têm apontado a cafeína como

possível agente ergogênico em tais situações (Altimari et al., 2000).

No entanto, vale ressaltar que esse efeito da cafeína durante os exercícios físicos anaeróbios pode estar relacionado à sua ação direta em alguma parte do sistema nervoso central (SNC) e, ainda, afetar a percepção subjetiva de esforço e/ou a propagação dos sinais neurais entre o cérebro e a função neuromuscular (Spriet, 1995; Davis et al., 2003).

Graham et al. (2008), realizando experimento *in vitro*, constatou que a cafeína aumenta a força de contração muscular, visto relatar que na presença desse fármaco ocorre diminuição do limiar de excitabilidade das fibras musculares. Observa esse autor que as doses de cafeína utilizadas no estudo foram elevadas, tóxicas e letais para o organismo humano.

Complementarmente, Davis et al. (2003), afirma que durante a contração muscular a concentração de adenosina aumenta no músculo e no plasma, notadamente porque a cafeína atua antagonicamente em relação a esses receptores, cujos efeitos fisiológicos são: aumento na liberação de catecolaminas, pressão sanguínea, lipólise, das secreções gástricas, diurese e ativação do SNC.

Como resultado da ação farmacológica da cafeína, Snyder et al. (1981) e Svenningtsson et al. (1997), argumentam que o efeito estimulante da cafeína provoca aumento na atividade motora de roedores. Portanto, a cafeína pode agir diretamente sobre o músculo e potencializar a capacidade de realizar exercícios físicos de alta intensidade e curta duração (Lopes et al., 1983).

Nehlig & Debry (1994), dizem que a melhoria no desempenho físico do atleta está relacionada à ação da cafeína sobre o organismo, haja vista estimular a mobilização intracelular de cálcio do retículo sarcoplasmático e prolongar o período de ação do cátion e disponibilizá-lo prontamente à contração muscular; inibir a

enzima fosfodiesterase, responsável pela degradação da adenosina monofosfato-cíclico (AMPc); antagonizar os receptores de adenosina; e aumentar o consumo de lipídeos pelos músculos em atividade.

Vem daí o entendimento de que a interação entre a suplementação de cafeína e a atividade física regular pode produzir efeitos sobre o comportamento do indivíduo suplementado (Barbosa, 2007).

### 1.3 Ação farmacológica da cafeína

Na qualidade de fármaco, conforme afirmam Clarkson (1993), Slavin & Joensen (1995) e Barone & Roberts (1996), trata-se de estimulante do SNC abundante na dieta humana, eis que presente em bebidas como o café, chocolate, guaraná, mate, além de outros chás e refrigerantes.

Tabela 1: Principais fontes de cafeína na dieta

<b>PRODUTO</b>	<b>Volume ou Peso</b>	<b>Conteúdo médio de cafeína (mg)</b>
Café moído e torrado	150 mL	83
Café instantâneo	150 mL	59
Chá em saquinhos	150 mL	30
Chá em folhas	150 mL	41
Chá instantâneo	150 mL	28
Chocolate em barra	28 g	20
Chocolate ao leite	28 g	6
Achocolatado	240 mL	5
Refrigerante de cola	180 mL	19
Refrigerante de cola <i>diet</i>	180 mL	21

Fonte: Adaptado de Barone & Roberts (1996).

A cafeína também está presente em alguns medicamentos cuja ação se

opõe ao efeito calmante de determinados fármacos (Spriet, 1995; Sinclair & Geiger, 2000), dentre os quais, vale dizer, encontram-se os medicamentos prescritos para resfriados e alergias, analgésicos (15 a 64 mg/U), moderadores de apetite (50 a 200 mg/U) e estimulantes (100 a 200 mg/U) (Srisuphan & Bracken, 1986).

Considerada suplemento alimentar pela agência americana de controle de alimentos e medicamentos (*U.S. Food and Drug Administration - FDA*), a cafeína está presente em cerca de mil fármacos prescritos e dois mil não prescritos, sendo os últimos comumente ingeridos junto a outras substâncias (Bracken, 1982).

Nessa vertente, vale destacar que, referidos fármacos podem ser importante fonte suplementar de cafeína para uma parcela da população, particularmente àqueles indivíduos que não consomem alimentos e/ou bebidas contendo cafeína.

Em termos de ação farmacológica, ocorre que derivado à xantina, a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) após absorvida é metabolizada no fígado e, posteriormente, nos rins e no cérebro. Nesse eixo, Davis et al. (2003), referem que a desmetilação da cafeína resulta na formação de três grupos metilxantina metabolicamente ativos, quais sejam: paraxantina (84%), teobronina (12%) e teofilina (4%). Nesse ponto, importa destacar, há similaridade estrutural entre as xantinas, mas, no entanto, elas se diferenciam entre si pela potência da ação farmacológica sobre o SNC (George, 2000).

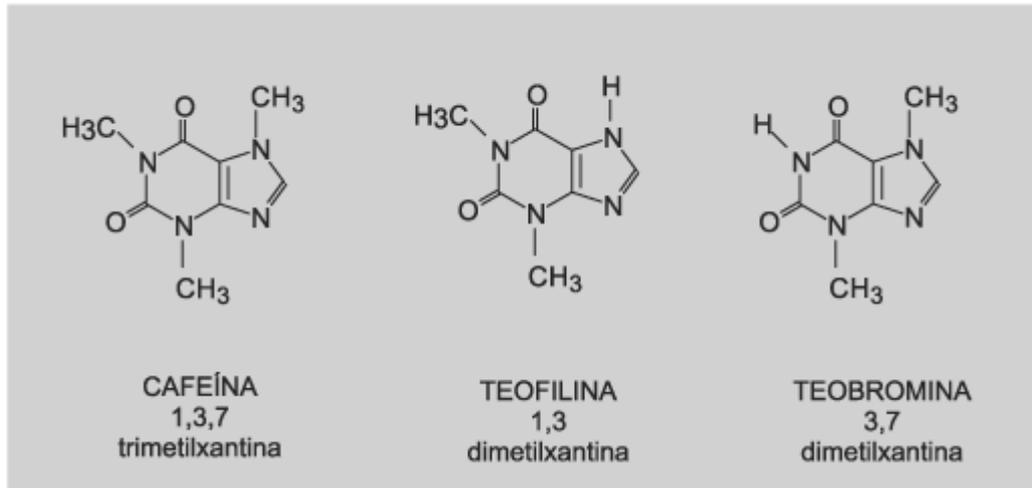


Figura 1: Estrutura química da cafeína e metilxantinas relacionadas.  
Fonte: Altimari et al. (2006).

Fisone et al. (2004) e Hoexter et al. (2005), argumentam que ação farmacológica da cafeína no SNC está atrelada à sua habilidade em se opor a ação da adenosina endógena e, inespecificamente, bloquear seus receptores do tipo  $A_1$  e  $A_{2A}$ .

Nesse sentido, Dixon et al. (1996) Palmer & Stiles (1995), relatam que os receptores de adenosina do tipo  $A_1$  estão amplamente distribuídos em todo o cérebro, situam-se significativamente nas camadas corticais, no hipocampo e no estriado. Diferentemente, os receptores  $A_{2A}$  ficam posicionados juntos à região do estriado, onde também estão situados os receptores de dopamina, conforme afirmam Dixon et al. (1996) e Palmer & Stiles (1995). A ativação dos receptores de adenosina  $A_1$  provoca inibição da liberação de alguns neurotransmissores, como o glutamato e a dopamina, e a inibição da atividade neuronal por induzir hiperpolarização pós-sináptica (Brundege & Dunwiddie, 1996). E, por síntese, Hoexter et al. (2005), dizem que ao agir nos receptores adenosinérgicos  $A_1$ , a cafeína reprime os efeitos inibitórios da adenosina e provoca efeitos estimulantes.

Por sua vez, Laurienti et al. (2002), afirmam que nesse processo a ação da cafeína faz liberar neurotransmissores, como as catecolaminas, serotonina e

acetilcolina associados a vasoconstrição no cérebro. Ainda, a vasoconstrição leva à diminuição do fluxo sanguíneo cerebral e ao aumento do metabolismo, que também é estimulado pela inibição da cafeína sobre o efeito vasodilatador da adenosina (Siepmann & Kirch, 2002).

Decerto, os efeitos da cafeína sobre a atividade motora são mais evidentes devido a sua ação antagônica nos receptores de adenosina  $A_{2A}$ , os quais possuem interação com os receptores de dopamina (Fisone et al., 2004). Nesse norte, Feoktistov & Biaggioni, (1997), indicam que a afinidade da cafeína com os receptores de adenosina  $A_{2B}$  e  $A_3$  é baixa, e o nível basal de ativação desses receptores não é significativo. Assim sendo, o aumento da atividade motora pode ser medido e controlado através de circuitos cerebrais e, em função disso, as mudanças comportamentais podem ser representadas pela propriedade estimulante da cafeína e pelo mecanismo de ação que lhe é particular (Fisone et al., 2004).

#### **1.4 Efeito da Cafeína sobre a Ansiedade**

Nesse ponto, cumpre frisar que tendo em vista a brevidade do efeito estimulante da cafeína, Silverman et al. (1992) desenvolveram estudo em ambiente controlado, durante o qual foi produzida ligeira síndrome de abstinência pela interrupção brusca na ingestão diária de café. Por sua vez, Juliano & Griffiths (2004), constataram que os sintomas mais comuns encontrados foram: fadiga, ansiedade e depressão, náuseas, vômitos, cefaléia e diminuição da concentração.

A ocorrência de ansiedade, com a retirada súbita da cafeína, ocorre mesmo em indivíduos que consomem doses baixas desse fármaco (50 a 150 mg/dia) (Griffiths et al., 1990). O estudo desses autores revelou que a abstenção à

caféina causou nos indivíduos a sensação de fadiga e sedação, como também, durante o período de abstinência, os sujeitos referiram cefaléia e náusea.

Outro importante achado é o de Strecker et al. (2000), haja vista afirmarem que a adenosina apresenta função reguladora do sono, especialmente porque a perda do sono está associada à ingestão de caféina. Porkka-Heiskanen et al. (2002), revelaram que a ação inibitória local da adenosina ocorre em auto-receptores específicos  $A_1$  das células colinérgicas do prosencéfalo basal. Conforme esses teóricos, a redução da atividade dessas células desinibe as células gabaérgicas do sistema inibitório ao mesmo tempo em que deixam de estimular o sistema hipocretinas, dando início ao sono ao final do período de atividade ou vigília.

Por outro lado, o exercício físico intenso tanto pode levar ao aumento da produção quanto ao desequilíbrio entre as substâncias oxidativas e as defesas oxidantes dos tecidos, o que pode provocar danos oxidativos às proteínas, lipídios e DNA com resultados importantes às células (Davis et al., 2003).

### **1.5 Estresse oxidativo e exercício físico**

No que importa à produção de estresse oxidativo decorrente de exercício físico, sabe-se que os radicais livres (RLs) são átomos ou moléculas que, em virtude de seus elétrons desemparelhados nas camadas de valência, apresentam significativa reatividade a outras moléculas, a fim de encontrar um estado químico estável. Cada RL possui pelo menos um elétron não pareado em seu orbital externo, porquanto, é altamente reativo (Halliwell & Gutteridge, 2000; Powers & Howley, 2000). Sjodin et al. (1990), Pereira et al. (1994), Aruoma (1994), citam como exemplos de espécies reativas: oxigênio molecular ( $O_2$ ), radical hidroxil ( $OH\bullet$ ), ânion

superóxido ( $O_2^-$ ), radical peroxil ( $ROO\bullet$ ), radical alcóxil ( $RO\bullet$ ) e óxido nítrico (NO).

Dentre os RLS, o radical hidroxil e o ânion superóxido apresentam importância biológica, eis que produzidos fisiologicamente no organismo humano através de processos metabólicos oxidativos à produção de energia. A produção dos RLs é, por vezes, de extrema importância à ativação do sistema imunológico e à desintoxicação de fármacos (Schneider & Oliveira, 2004).

Por outro lado, quando em excesso, os RLs podem oxidar os elétrons de alguns compostos, como proteínas, lipídeos e DNA, e provocar sérios efeitos deletérios ao sistema biológico (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Nessa perspectiva, o SNC é particularmente mais suscetível a danos oxidativos, notadamente porque exerce elevada atividade energética mitocondrial dependente de oxigênio, sendo que essa atividade está relacionada à alta concentração de ferro livre e lipídios poli-insaturados, e também ao baixo nível de glutatona e enzimas antioxidantes (Behl, 2005; Coskun et al., 2005).

Em contrapartida, sabe-se também que os organismos dispõem de mecanismos enzimáticos e químicos para se protegerem contra oxidações. Esses mecanismos agem quando os organismos ficam expostos a espécies reativas, como o oxigênio (EROs), por exemplo. Contudo, também é sabido que as enzimas antioxidantes como as superóxido dismutases (CuZn-SOD - citosólica e extracelular; Mn-SOD - mitocondrial), catalase e glutatona peroxidase (GPX) decompõem o ânion superóxido, o  $H_2O_2$  e os lipoperóxidos, respectivamente.

Referidos processos químicos se desencadeiam a partir da ação de algumas moléculas com propriedades antioxidantes, que diminuem a ação tóxica das EROs produzidas intra e extracelularmente, tais como: o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, selênio, ácido ascórbico (vitamina C), glutatona reduzida (GSH) (YU

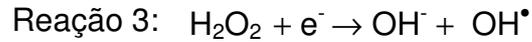
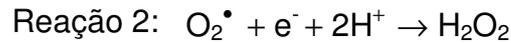
et al., 2003). Embora presentes em alguns alimentos, significativa parcela desses antioxidantes pode ser ingerida na forma de suplemento alimentar.

Koury & Donangelo (2003), constataram que o exercício físico provoca aumento de 10 a 20 vezes no consumo total de oxigênio do organismo, de 100 a 200 vezes na captação de oxigênio pelo tecido muscular e favorece o aumento na produção das EROs.

Os RLs formados durante o exercício físico podem contribuir para a fadiga muscular, inativação de algumas enzimas do ciclo de Krebs e alteração no equilíbrio da redução do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons (Powers & Howley, 2000).

Em contrapartida, o treinamento físico possui a capacidade de promover adaptações à diminuição dos efeitos deletérios provocados pelos RLs. Essas adaptações contribuem para a resistência tecidual em desafios oxidativos, como aqueles proporcionados pelo exercício de alta intensidade e longa duração, por exemplo (Halliwell & Gutteridge, 2000).

O oxigênio é metabolizado no organismo, onde aproximadamente 85 a 90% é utilizado na mitocôndria em processos oxidativos dentro da cadeia de transporte de elétrons, e os 10 a 15% restantes são recrutados por algumas enzimas oxidases e oxigenases, como também por reações químicas de oxidação direta (Halliwell & Gutteridge, 2000). Com relação aos aproximados 2 a 5% restantes, esses são diminuídos univalentemente em EROs (Halliwell & Gutteridge, 2000). Note-se que algumas dessas reações dão origem ao ânion superóxido (reação 1), ao peróxido de hidrogênio (reação 2) e ao radical hidroxila (reação 3), conforme segue abaixo:



De acordo com König & Berg (2002), dependendo do tipo de exercício e intensidade, as rotas metabólicas para a produção das EROs durante esses eventos pode acontecer da seguinte maneira: 1) com o aumento na produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  na cadeia respiratória; 2) a xantina oxidase (XO) catalizar a degradação do AMP durante o trabalho muscular isquêmico e levar ao aumento na produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ; 3) ativação de neutrófilos polimórfos (PNM), ou leucócitos de defesa do organismo, após danos musculares induzidos por exercício; e 4) com o metabolismo de gorduras.

Carmeli et al. (2000), referem que o estresse oxidativo tem sido associado à diminuição da performance, à fadiga, ao dano muscular e ao *overtraining*. Por essa razão, alguns pesquisadores, como Alessio et al. (1999), sugerem que a redução do estresse oxidativo pode melhorar a performance e a tolerância ao exercício.

Nesse viés, Schneider & Oliveira (2004), observam o grau de estresse oxidativo e o dano muscular associados ao exercício físico intenso não depende somente do tipo e intensidade do exercício, mas também do grau de exaustão do indivíduo que realiza o exercício.

Para Leeuwenburgh et al. (1997), o estresse oxidativo provocado pelo exercício pode gerar adaptações em resposta ao exercício físico intenso ao mesmo tempo em que essas adaptações são tecido-específicas, só por si, isso remete ao entendimento de existir um mecanismo regulatório complexo do processo oxidativo.

Leaf et al. (1997), contribuem com o entendimento de que o exercício físico em indivíduos saudáveis produz a peroxidação lipídica transitória, com

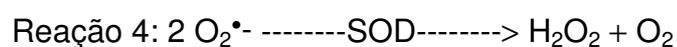
remoção dos produtos da peroxidação durante a fase de recuperação. E Childs et al. (2001), referem que esses exercícios provocam aumento da atividade respiratória mitocondrial, seguido de aumento na produção das EROs pela incompleta redução do oxigênio. E, como resposta aos danos musculares resultantes do exercício físico intenso, neutrófilos e macrófagos migram e infiltram no tecido muscular lesado, e ativam citocinas pró-inflamatórias que produzem as EROs adicionais.

Costill et al. (1978) e Ivy (1979) sugerem que a cafeína aumenta a concentração de ácidos graxos livres (AGL), o que contribui para elevação do catabolismo de lipídeos nos músculos em atividade, reduz o catabolismo de carboidratos e, desse modo, poupa o estoque corporal de carboidratos.

Ao seu turno, Ji (1995), afirma que as mudanças na lipoperoxidação são as mais freqüentes evidências de estresse oxidativo no músculo esquelético e que formas diferenciadas de exercícios resultam diferentes níveis de estresse.

### 1.5.1 Superóxido dismutase (SOD)

Matsubara & Ferreira (1994), referem que o SOD é a enzima responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  na presença de próton  $\text{H}^+$  (reação 4). Nos sistemas eucariontes, atualmente se conhecem duas isoformas dessa enzima, quais sejam, a  $\text{Zn}^{2+}$ -SOD, presente principalmente no citosol, e a  $\text{Mn}^{2+}$ -SOD, localizada primariamente na mitocôndria.



Lancha-Jr (2004), argumenta que o radical ânion superóxido, só por si, é

instável e que a reação de dismutação desse radical ocorre normalmente em meio aquoso, onde tem o papel de acelerar o processo que ocorre mais rapidamente em valores baixos de pH. Complementarmente, diz que essa é uma situação corriqueira durante exercícios físicos intensos.

### 1.5.2 Catalase (CAT)

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática e sua função é converter o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (reação 5). Nos seres humanos é encontrada na maioria dos órgãos, tais como: fígado, cérebro, coração e músculo esquelético, medula óssea e mucosas e sua atividade é dependente de NAPH (Scott et al., 1991).



Amplamente distribuída pela célula, a catalase é encontrada em concentrações maiores nos peroxissomas, aparece no músculo esquelético e possui maior atividade junto a fibras vermelhas do que em fibras brancas (Halliwell & Gutteridge, 2000).

### 1.6 Cafeína, estresse oxidativo e exercício físico

A cafeína, devido sua estrutura química, é um potente quelante de RLs e atua na diminuição da peroxidação lipídica, na carbonilação de proteínas e no dano ao DNA (Devasagayam et al., 1996). Enquanto antioxidante, ela atua especificadamente recebendo o elétron desemparelhado do RL e, assim, impede a

iniciação da reação em cadeia (Troup et al., 1988).

Nesse sentido, Kesavan & Powers (1985), observam que a cafeína serve como um potente antioxidante do radical hidroxil, oxigênio *siglet* e radical peroxil. Devasagayan et al. (1996), demonstraram diminuição nos marcadores de estresse oxidativo após a sua utilização em fígado de ratos.

Brown et al. (1993), Chapman & Stager (2008), demonstraram que, a utilização de cafeína tem causado aumento da ventilação alveolar durante o exercício. Turley & Gerst (2006), observaram mudanças cardiovasculares. E Radak et al. (2005), Pinho et al. (2006) e Aguiar et al. (2008), concluíram sobre que o aumento do consumo de oxigênio durante e após os exercícios físicos pode acentuar a produção de EROs em diversos tecidos e que a suplementação de cafeína talvez possa inibir os efeitos deletérios provocados pelos radicais livres no cérebro de camundongos.

A razão do interesse em conhecer o assunto problematizado se deve à curiosidade despertada em observação a debates que se têm formado acerca de questões relacionadas à suplementação de cafeína em atletas de alto rendimento e estresse oxidativo.

Por conseguinte, a importância de estudar o tema proposto reside, basicamente, no fato de se avaliar os efeitos da cafeína sobre os níveis de ansiedade e em parâmetros oxidativos em proteínas e lipídeos no estriado e córtex pré-frontal de animais tratados com e sem cafeína, submetidos a treinamento físico progressivo e moderado; como também, avaliar o comportamento da atividade das enzimas Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD), no estriado e córtex pré-frontal em animais.

Diante do que foi acima exposto, a importância do tema assume destaque

junto à comunidade científica e também junto a outras esferas da sociedade dentre, as quais instam dizer, estão à comunidade acadêmica, atletas, praticantes de exercício físico e a sociedade em geral, visto esta última encampar significativa parcela de usuários de produtos cafeinados.

Assim, questiona-se: Quais os efeitos que a cafeína provoca sobre os níveis de ansiedade e em parâmetros de estresse oxidativo nas regiões cerebrais estriado e córtex pré-frontal de camundongos submetidos a treinamento físico progressivo e moderado em piscina?

E, encetando possíveis resultados, levantam-se as seguintes hipóteses:

- O exercício físico progressivo e moderado em piscina altera os níveis de ansiedade de camundongos.
- A administração da cafeína altera os níveis de ansiedade de camundongos submetidos a treinamento físico progressivo e moderado em piscina.
- A produção de EROs induzida pelo treinamento físico progressivo e moderado em piscina é alterada, resultando em modificações no sistema oxidante/antioxidante celular.
- A cafeína pode diminuir o estresse oxidativo e aumentar as defesas antioxidantes do organismo nas regiões cerebrais (estriado e córtex pré-frontal) de camundongos submetidos a treinamento físico moderado em piscina.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da cafeína por parâmetros celulares de estresse oxidativo em cérebro de camundongos submetidos a treinamento físico progressivo e moderado em piscina.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar o efeito da interação entre cafeína e exercício físico progressivo e moderado nos níveis de ansiedade em camundongos.
- Investigar o efeito do treinamento físico progressivo e moderado em piscina nos parâmetros oxidativos em lipídeos e proteínas no estriado e córtex pré-frontal de animais tratados com e sem cafeína.
- Investigar o efeito do treinamento físico progressivo e moderado de camundongos em piscina na atividade das enzimas Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD), no estriado e córtex pré-frontal em animais tratados com ou sem cafeína.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais experimentais e tratamento**

Para conduzir o estudo, foram utilizados camundongos albinos CF-1, machos adultos (2 meses), pesando 30-40g provenientes da FEPES (RS) e mantidos no biotério da UNESC. Os animais foram abrigados em caixas (5 por gaiola), mantidos em ciclo de 12 horas claro/escuro, com acesso livre ao alimento e à água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o guia da saúde para o cuidado e o uso de animais de laboratório e da Sociedade Brasileira de Neurociências e do Comportamento (SBNeC) para o cuidado animal e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense, conforme protocolo n. 742/2007.

Sessenta animais foram divididos em quatro grupos: nT-cont = animais não treinados na piscina (grupo controle, n = 15); nT-caf = animais não treinados na piscina que receberam cafeína da dose de 0,3 g/L durante o treinamento (n=15); T-cont = animais treinados na piscina (n = 15); T-caf = animais treinados na piscina que receberam cafeína durante o treinamento.

Durante as oito semanas de treinamento em piscina, os grupos de animais tratados com cafeína recebeu solução de cafeína (0,3 g/L; CALBIOCHEM, Estados Unidos e Canadá) na garrafa de água como única bebida disponível. Os animais beberam em média 25 mL de cafeína ou água diariamente, o que equivale a 75 mg de cafeína por dia para cada animal. A solução de cafeína foi trocada a cada 3 dias para uma solução fresca. A dose de cafeína utilizada é considerada proporcional a 1 xícara de chá de café/dia para homens (Silva et al., 2005).

### **3.2 Protocolo de treinamento**

O protocolo de treinamento foi adaptado de Soares et al. (2008). Os camundongos foram colocados individualmente na piscina com água aquecida à temperatura constante de 37 °C, com profundidade tal que os animais não encostassem as patas ou a cauda no fundo da piscina. Todos os animais foram cuidados por um observador para que não se afogassem ou tentassem se apoiar nas paredes da piscina.

Na semana inicial do treinamento foram utilizados 5 dias para adaptação, durante essa semana os animais nadaram durante 20 minutos, com intervalo de 5 minutos de recuperação no meio da sessão.

Após a semana de adaptação, o tempo de treinamento aumentou para 40 minutos, com 5 minutos de recuperação. Essa rotina seguiu durante 5 semanas, sendo que a intensidade do trabalho progrediu nas 3 semanas seguintes, quando os animais treinaram durante 50 minutos, com 5 minutos de recuperação, totalizando 8 semanas de treinamento. Ao final de cada dia de treinamento, os animais foram mantidos em ambiente aquecido para que ficassem completamente secos antes de retornem ao biotério.

### **3.3 Teste comportamental no Labirinto em cruz elevado (*Elevated Plus-Maze*)**

O labirinto em cruz elevado é um aparelho que consiste em dois braços abertos (30 x 5 cm x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) dispostos de forma perpendicular formando uma plataforma central (5 x 5 cm), com 50 cm de altura do chão (Lister, 1987). Os experimentos foram conduzidos em sala escura

com luz vermelha posicionada a 30 cm de altura da plataforma central. Os parâmetros avaliados foram os seguintes: número de entradas e tempo de permanência no braço aberto ou no fechado, e número de entradas em ambos os braços.

Os animais foram colocados na plataforma central e tiveram 5 minutos para explorar o aparelho (Pellow et al., 1985). O comportamento padrão para estes animais é apresentar uma nítida preferência pelos braços fechados. O mecanismo subjacente seria um conflito entre comportamentos inatos com a tendência à exploração de ambientes novos, que seria um estímulo à exploração dos braços abertos, de um lado e a aversão aos espaços abertos e à novidade do aparelho do outro, que consistiria em um estímulo à redução da exploração dos braços abertos (Handley & Mithani, 1984; Pellow & Colab, 1985; Treit & Colab, 1993).



Figura 2: Labirinto em Cruz elevada para Camundongos

### **3.4 Medidas de estresse oxidativo**

A coleta de material biológico foi efetuada 24 horas após a última sessão de treinamento físico. Os animais foram sacrificados por decapitação e o cérebro de cada foi extraído e fracionado nas áreas cerebrais de interesse, quais sejam,

estriado e córtex pré-frontal. Nesse ponto, cumpre observar, as amostras coletadas foram armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### **3.4.1 Danos oxidativos à biomoléculas**

#### **3.4.1.2 Carbonilação de proteínas**

Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de formação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilidrazina, conforme previamente descrito por Levine et al. (1990).

Após homogenização das amostras em tampão carbonil (120mM KCl, 30mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) foram centrifugadas a 7000 *g* por 15min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e lisadas em TCA 20%.

Posteriormente à lise, as amostras foram novamente centrifugadas a 14000 *g* por 5 min. O pellet foi re-suspenso em 100  $\mu\text{L}$  de 0,2 M de NaOH e as amostras incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com 2 M de HCl (1:3) adicionado de 10 mM de DNPT.

Depois do período de incubação, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de tca 20%, e as amostras foram centrifugadas a 14000 *g* por 3min. O pellet foi lavado com 500  $\mu\text{L}$  de etanol-etilacetato. As amostras foram incubadas por 30 min a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , centrifugadas novamente a 14000 *g* por 3min. O conteúdo de formação de carbonil foi determinado espectrofotometricamente em 370nm utilizando-se um coeficiente  $22.0000\text{ molar}^{-1}$ . Os dados estão expressos como nmol de grupos carbonil/mg de proteínas.

### 3.4.1.3 Formação de sulfidrilas

O ácido ditionitrobenzóico é reduzido por tióis gerando um derivado amarelo (TNB) lido espectrofotometricamente a 412 nm. Esse método determina os tióis totais da amostra, sendo um parâmetro de medida de dano oxidativo às proteínas da mesma (Aksenov & Markesbery, 2001).

Nesse sentido, as amostras foram homogeneizadas em 1 mL de tampão PBS (7,4 pH) com 1 mM de EDTA e incubadas por 60 min, à temperatura ambiente o escuro com 0,2 M de fosfato de potássio e 0,4% de ácido ditionitrobenzóico. Os dados estão expressos como nmol de TNB/mg de proteínas.

### 3.4.1.4 Xilenol laranja

Esse método quantifica a formação de hidroperóxidos, que é um produto da lipoperoxidação. Baseia-se no princípio de que os hidroperóxidos oxidam ferro a íon férrico que, por sua vez, se liga ao corante xilenol laranja (Jiang et al., 1991). Aproximadamente 0,050g de tecido foi homogenizado em 1mL de tampão PBS (fosfato pH 7,4). Retirou-se 100 µL dessa solução e adicionou-se 900 µL de solução trabalho (100 µM xilenol laranja; 25mM ácido sulfúrico; 4mM butilhidroxitolueno; 250 um Sulfato ferroso). Após incubação por 2 horas em solução trabalho, à temperatura ambiente, foi feita a leitura de cor no espectrofotômetro a 560nm. Os dados estão expressos como µmol LOOH/mg protein.

### **3.4.2 Atividade de enzimas antioxidantes**

#### **3.4.2.1 Catalase (CAT)**

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática e sua função é converter o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . Nos seres humanos é encontrada na maioria dos órgãos, tais como: fígado, cérebro, coração e músculo esquelético, medula óssea e mucosas e sua atividade é dependente de NADPH (Scott et al., 1991). Porquanto, a atividade da CAT foi determinada pela queda na absorbância (240nm) correspondente ao consumo de peróxido de hidrogênio, conforme previamente descrito por Aebi, (1984). As amostras em tampão fosfato foram homogeneizadas, centrifugadas em 3000g por 10min, foi pipetada em cubeta de quartzo 50ul de amostra + 1ml de tampão fosfato e zerou-se o espectro. Foi utilizado o tampão fosfato com peróxido de hidrogênio para fazer a leitura. Adicionou-se 50uL de amostra + 1mL de peróxido de hidrogênio e foi feita a leitura nos tempos de 0 segundos, 30 segundos e 60 segundos. Os dados estão expressos como U/mg de proteínas.

#### **3.4.2.2 Superóxido dismutase (SOD)**

Trata-se de enzima responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ , na presença de próton  $\text{H}^+$ . Sua composição apresenta diferentes grupos protéicos. Nos sistemas eucariontes, atualmente se conhecem duas formas: a) SODCuZn que está presente principalmente no citosol; b) SOD-Mn está localizada primariamente na mitocôndria (Matsubara & Ferreira ,1997).

Nessa perspectiva, a atividade enzimática da SOD foi determinada pela

inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm), segundo Bannister & Calabrese (1987).

O tecido cerebral foi homogenizado em 1 mL de tampão glicina (10,2 PH). Utilizou-se 10ul, 20ul e 30ul de amostra para fazer a leitura. Pipetar 10ul de catalase + 970 ul de tampão glicina (32º) e dar o branco. Foi colocada a adrenalina (17ul) e feita a leitura durante 180 segundos. Posteriormente a primeira leitura, foi adicionado 10 ul de catalase + à quantidade de amostra (10, 20 ou 30 ul) + 970 ul de tampão glicina e zerado o espectro. Adicionou-se 17 ul de adrenalina e feita a leitura novamente em 180 segundos. Os dados estão expressos como U/mg de proteínas.

#### **3.4.2.3 Determinação da proteína**

A quantidade de proteínas nos ensaios da SOD, CATALASE, TIÓIS TOTAIS, TBARS e CARBONIL foram mensuradas utilizando-se a técnica de Lowry et al. (1951).

Procedimento: O tecido foi homogeneizado em tampão correspondente a cada experimento. Foi pipetada a curva utilizando-se a relação de 0,5mg de BSA (albumina) para 1ml de H<sub>2</sub>O. Colocou-se 10ul da amostra homogenizada em 190 H<sub>2</sub>O e feito o vortex. Foi pipetado 1 ml de reagente C em todos os pontos, dado o vortex e esperado 10min Colocou-se 100ul de folin (1N) em todos os tubos (vortex) e esperou-se 30min. Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 700nm cubeta de plástico.

### 3.5 Análise estatística

Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados comportamentais foram analisados pelo teste *t*-Student para amostras independentes. As medidas bioquímicas foram analisadas pela análise de variância de duas vias (two-way ANOVA), tendo como fatores o exercício físico e o tratamento com cafeína, utilizando-se *post hoc* Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de  $P < 0,05$ . Foi utilizado o STATISTICA (*Stat Soft Inc.*) versão 7.0 como pacote estatístico.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Teste comportamental

O treinamento progressivo de natação durante oito semanas com ou sem a administração de cafeína modificou os padrões comportamentais dos camundongos. A figura 3A apresenta as médias absolutas dos tempos em que os animais permaneceram nos braços abertos no Labirinto em cruz-elevado. No grupo de animais treinados que recebeu água (T-cont) verificou-se um efeito do tipo ansiogênico em relação ao grupo dos animais não treinados que recebeu água (nT-cont). Entretanto no grupo de animais treinados tratados com cafeína (T-caf) observou-se uma prevenção significativa deste efeito ansiogênico induzido pelo treinamento (T-cont). Os animais não treinados que receberam cafeína (nT-caf) apresentaram o comportamento natural no labirinto, como ao verificado para os nT-cont. Os valores apresentados nas figuras 3B e 3C avaliam a frequência de entradas nos braços abertos e entradas em ambos os braços (abertos mais fechados), respectivamente. Esses dois parâmetros são indicativos do comportamento de ansiedade animal (Lister, 1987).

O treinamento progressivo de natação durante oito semanas diminuiu consideravelmente o tempo gasto nos braços abertos do labirinto, demonstrando o efeito ansiogênico desta atividade física. Esta avaliação também foi determinada pelo número de entradas nos braços abertos, onde os animais apresentaram diferença significativa entre o grupo T-controle e o grupo T-caf (figura 3B).

Todos os animais, dos diferentes grupos experimentais, apresentaram os mesmo números de entradas totais (soma das entradas nos braços aberto com as

entradas nos braços fechados) (figura 3C), o que representa que não houve alteração da atividade locomotora dos animais T-cont ou T-caf.

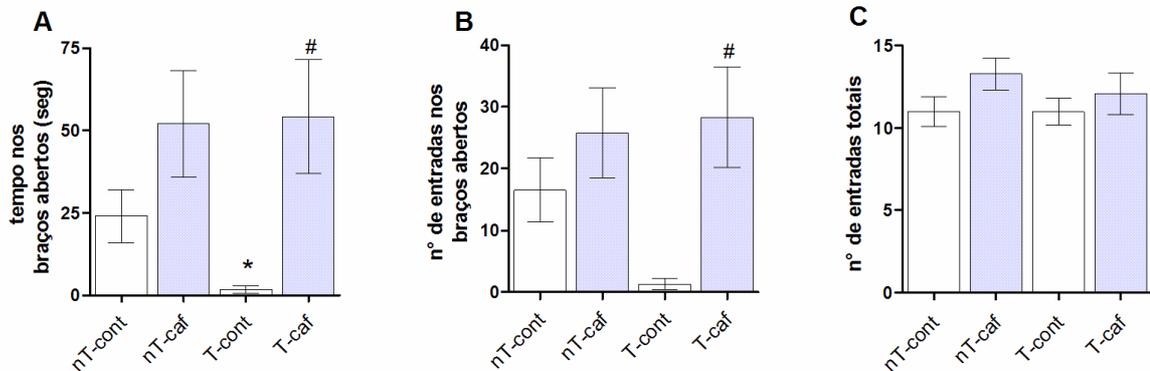


Figura 3: Efeito do treinamento físico de oito semanas e da administração crônica de cafeína sobre o tempo gasto nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado. Os valores são apresentados em média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 15$  por grupo) e os resultados estão expressos por tempo em segundos. Os dados foram comparados por Teste  $t$  de Student. \* $P < 0,05$  quando comparado ao grupo nT-cont. # $P < 0,05$  quando comparado ao grupo T-cont.

#### 4.1.2 Dano oxidativo a biomoléculas e atividade enzimática

O treinamento progressivo de natação durante oito semanas com ou sem a administração de cafeína foi capaz de promover algumas alterações significativas nas biomoléculas, proteínas e lipídeos, avaliadas nas regiões cerebrais de interesse (estriado e córtex pré-frontal de camundongos).

De acordo com os resultados apresentados na figura 4 que representa dano de proteínas e lipídeos no estriado de camundongos, a figura 4A demonstra um aumento significativo na carbonilação de proteínas no grupo de animais T-caf em relação ao grupo nT-cont e T-cont. No entanto referente à degradação de grupos sulfidrila em proteínas e da peroxidação de lipídeos (figura 4B e 4C, respectivamente) não houve diferença estatística entre os grupos.

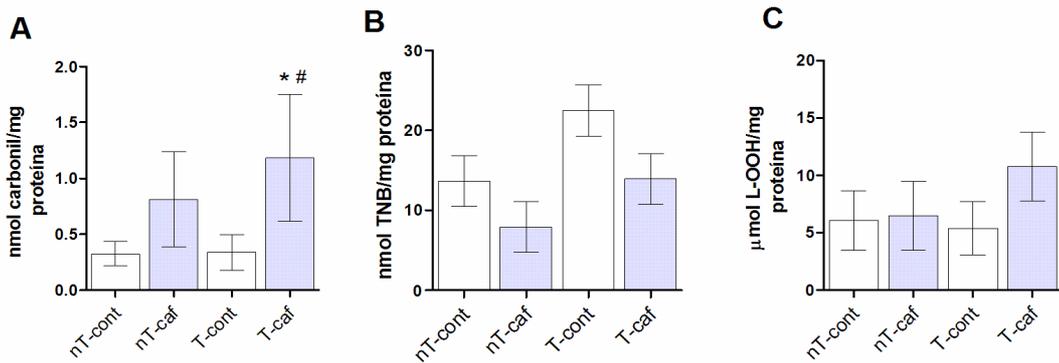


Figura 4: Efeito do treinamento físico de oito semanas e da administração crônica de cafeína sobre dano de proteínas e lipídeos no estriado de camundongos. A carbonilação de proteínas (A), conteúdo total de grupos tióis (B) e peroxidação de lipídeos (C) foram avaliados 24 horas após a última sessão de treinamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 5-8$  por grupo). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls. \* $P < 0,05$  quando comparado ao grupo nT-cont. # $P < 0,05$  quando comparado ao grupo T-cont.

A figura 5 representa danos a biomoléculas no córtex pré-frontal de camundongos. Os dados demonstram que houve níveis iguais de carbonilação de proteínas e presença de sulfidrilas entre os grupos experimentais, demonstrando que não houve alteração nas proteínas dos animais T-cont e T-caf (figura 5A e 5B, respectivamente). Entretanto, na figura 5C observa-se um aumento na lipoperoxidação no grupo dos animais T-cont em relação ao grupo dos animais nT-cont e nT-caf. Ainda, no grupo de animais T-caf houve aumento da lipoperoxidação quando comparado ao grupo nT-caf.

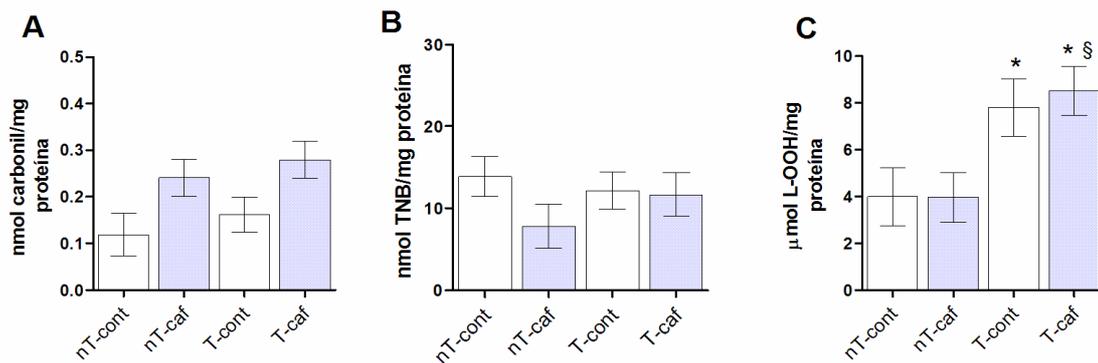


Figura 5: Efeito do treinamento físico de oito semanas e da administração crônica de cafeína sobre dano de proteínas e lipídeos no córtex pré-frontal de camundongos. A carbonilação de proteínas (A), conteúdo total de grupos tióis (B) e peroxidação de lipídeos (C) foram avaliados 24 horas após a última sessão de treinamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 5-8$  por grupo). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls.  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo nT-cont.  $^{\S}P < 0,05$  quando comparado ao grupo nT-caf.

Os valores apresentados nas figuras 6 e 7 avaliam a atividade das enzimas antioxidantes, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), no estriado e córtex pré-frontal de camundongos.

A figura 6A demonstra que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados quanto à atividade da CAT no estriado. No entanto, a atividade da SOD (figura 6B) apresentou um aumento significativo nos animais nT-caf quando comparados ao grupo nT-cont. Enquanto que, nos animais T-caf e T-cont não houve alteração na atividade da SOD no estriado destes animais.

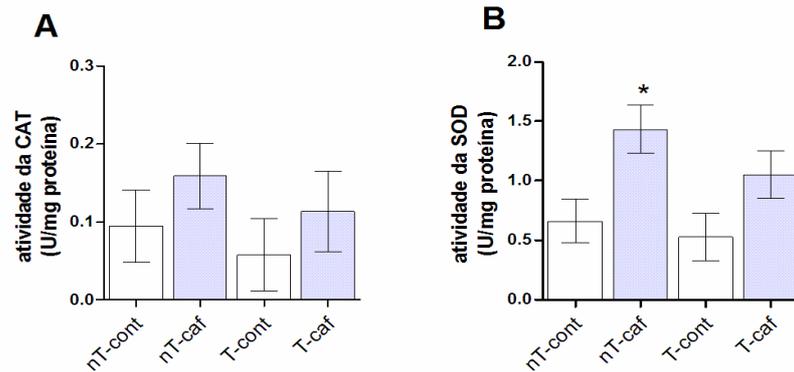


Figura 6: Efeito do treinamento físico de oito semanas e da administração crônica de cafeína sobre a atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) no estriado de camundongos. As atividades da CAT (A) e da SOD (B) foram avaliadas 24 horas após a última sessão de treinamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 5-8$  por grupo). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls. \* $P < 0,05$  quando comparado ao grupo nT-cont.

A figura 7A demonstra que no grupo dos animais T-caf houve aumento significativo da atividade da CAT no córtex pré-frontal em comparação ao grupo dos animais nT-cont e T-cont. Entretanto, a figura 7B demonstra que a atividade da SOD foi similar entre todos os grupos experimentais.

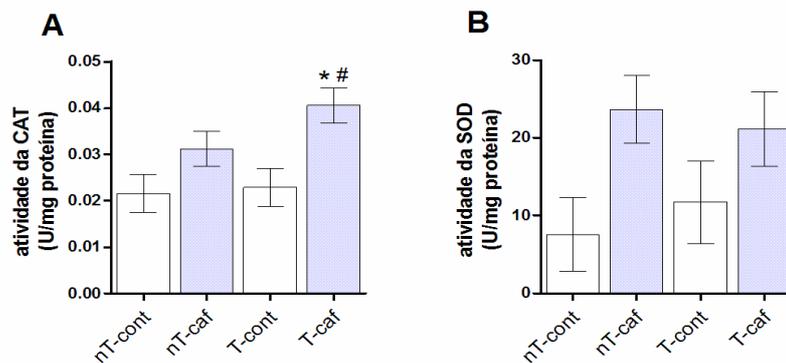


Figura 7: Efeito do treinamento físico de oito semanas e da administração crônica de cafeína sobre a atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) no córtex pré-frontal de camundongos. As atividades da CAT (A) e da SOD (B) foi avaliados 24 horas após a última sessão de treinamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 5-8$  por grupo). Os dados foram comparados por ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls. \* $P < 0,05$  quando comparado ao grupo nT-cont. # $P < 0,05$  quando comparado ao grupo T-cont.

## 5 DISCUSSÃO

Atualmente, existem definições e conceitos de ansiedade tanto como um sintoma quanto como uma patologia, que envolve aspectos multifatoriais, de caráter somático ou cognitivo. Normalmente, pode se manifestar em circunstâncias que demonstrem algum perigo originado por uma situação ameaçadora em específico ou, simplesmente, por alterações em nosso meio ambiente (Barros, 1996 apud Hetem & Graeff, 2004). Estes transtornos atingem a população geral, nas mais variadas categorias socioeconômicas, com maior prevalência no sexo feminino (Pigott, 2003) e, geralmente, em indivíduos acima de 18 anos de idade. A área do cérebro responsável para a aquisição e a expressão de condicionar do medo é a amígdala (Pare, 2004).

Diversos trabalhos demonstram que a prática de exercício pode levar à melhora de funções cognitivas como memória, atenção, raciocínio e praxia, existindo forte correlação entre o aumento na capacidade aeróbia e a melhora destas funções. Não estão totalmente esclarecidos quais são as tarefas cognitivas mais sensíveis ao exercício físico (Miles, 1998 apud Boxtel et al, 1992).

A cafeína é uma substância neuroativa muito consumida no mundo, presente em várias bebidas como café e chá, e exerce múltiplos efeitos no sistema nervoso central (SNC), sendo usada como adjuvante analgésico de vários fármacos. O tratamento crônico com cafeína e/ou seus metabólitos (teofilina, hipoxantina, etc.) há muito tempo vem sendo estudado por produzir tolerância, dependência física e síndrome de abstinência (Heishman & Henningfield, 1992), além de seus possíveis efeitos citoprotetores (Chen et al., 2001), citotóxicos (Kang et al., 2002) e anticancerígeno (He, 2003). Entretanto, pouco tem sido feito a respeito de cafeína,

exercício físico e estresse oxidativo no SNC.

O balanço entre defesas antioxidantes e a geração de radicais livres determina a extensão do dano causado pelas EROs (Papadopoulos et al., 1998), o que pode levar ao rompimento de constituintes celulares (Castagne et al., 1999). O sistema nervoso central é o mais vulnerável ao estresse oxidativo do que outros tecidos, pois contém alta quantidade de ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada, alto metabolismo oxidativo e tem comparativamente baixas defesas antioxidantes (Castagne et al., 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999).

No presente estudo avaliamos animais treinados em piscina e tratados cronicamente com baixa dose de cafeína. Em nosso estudo consideramos que as concentrações de cafeína e/ou seus metabólitos, os quais reproduzem vários efeitos da cafeína devem estar muito baixos no momento da decapitação dos animais, pois como os camundongos se mantêm acordados durante a noite, este é o horário em que eles mais ingerem alimentos e líquidos, logo também deverá ser o período de maior pico da cafeína plasmática, porém durante o dia a concentração da droga retorna para níveis próximos de zero (Johansson et al., 1993). Uma vez que em nosso trabalho os animais foram mortos no final do turno da manhã, neste período eles já estavam próximos aos níveis plasmáticos estarem baixos. Assim, os dados observados no presente estudo refletem o efeito celular tardio deixado pela cafeína, e não um efeito direto dela.

Nossos resultados demonstraram que, na análise comportamental pode-se observar que a cafeína agiu sobre o estresse provocado pelo exercício físico, diminuindo os níveis de ansiedade nos animais testados, reproduzindo o efeito de fármacos ansiolíticos, ou seja, o treinamento progressivo de natação durante oito semanas e/ou a administração de cafeína foi capaz de modificar os padrões

comportamentais dos animais. A figura 3 demonstra que as médias absolutas dos tempos e o número de entradas nos braços abertos apresentaram diferença significativa entre os grupos T-cont e T-caf. O grupo dos animais treinados que recebeu água (T-cont) induziu um efeito tipo ansiogênico em relação ao grupo dos animais não treinados que recebeu água (nT-cont). Entretanto o grupo dos animais treinados tratados com cafeína (T-caf) preveniu significativamente este efeito do tipo ansiogênico quando comparados ao grupo dos animais T-cont. Os animais não treinados que receberam cafeína (nT-caf) apresentaram o comportamento natural no labirinto, como ao verificado para os nT-cont. As figuras 3A e 3B avaliaram tempo e frequência de entradas, respectivamente nos braços abertos. Esses dois parâmetros são indicativos do comportamento de ansiedade animal (Lister, 1987). figura 3C demonstrou a ausência de diferença significativa entre os grupos, indicando que nem o treinamento ou a cafeína alteraram a atividade locomotora avaliada através do número de entradas totais em ambos os braços.

O comportamento padrão para estes animais é apresentar uma nítida preferência pelos braços fechados. O mecanismo subjacente seria um conflito entre comportamentos inatos com a tendência à exploração de ambientes novos, que seria um estímulo à exploração dos braços abertos, de um lado e a aversão aos espaços abertos e à novidade do aparelho do outro, que consistiria em um estímulo à redução da exploração dos braços abertos (Handley & Mithani, 1984; Pellow Colab, 1985; Treit e Colab, 1993). Alguns estudos têm demonstrado que drogas ansiolíticas aumentam o tempo de permanência e/ou o número de entradas nos braços abertos, enquanto que drogas ansiogênicas diminuem estes parâmetros. Entretanto, estes efeitos somente são considerados na ausência de alteração da atividade locomotora (Pellow & Colab, 1985; Rodgers & Cole 1994). Assim, no

presente estudo o treinamento progressivo de natação durante oito semanas foi capaz de induzir o comportamento do tipo ansioso nos animais, o que não é observado em outros modelos de exercício moderado em esteira ou nos modelos de exercício físico voluntário (Harri et al., 1999; Guskowska, 2004).

O estresse físico resultante do modelo animal de exercício aplicado neste estudo pode resultar em sobrecarga emocional e conseqüentemente em aumento dos níveis de ansiedade. Essas alterações são similares a mudanças promovidas por programas intensos de treinamento tanto em homens saudáveis como em atletas (Raglin, 1993). A maioria dos atletas sofrem com deterioração do humor sem perda da performance física. Os sintomas da síndrome do supertreinamento (*overtraining*) começam com problemas evidentes como perda do sono, perda do apetite e diminuição do peso, irritabilidade, dores musculares, aumento dos níveis de ansiedade e depressão (Raglin, 1993; Budget, 1990; Budget, 2000). A prevalência desta síndrome parece ser ainda mais presente em esportes de resistência e entre atletas de elite, devido às altas cargas de trabalho. Além disso, para alguns indivíduos o exercício físico pode tornar-se uma obsessão, resultando em uma exagerada preocupação com o exercício e com o treino excessivo. A maior parte dos indivíduos dependentes do exercício, não apresenta sinais imediatos de dano e boa saúde mental (Bamber et al., 2000; Blumenthal et al., 1984; Davis et al., 2003).

Segundo Felipe et al. (2005), a cafeína, em doses moderadas, pode produzir no desempenho intelectual. Inversamente, as doses elevadas podem causar sintomas de confusão mental, indução de erros em tarefas, aumento dos níveis de ansiedade. Podem ocorrer tremores nos músculos e taquicardia.

A dose crônica utilizada nesse estudo não pode ser caracterizada como alta dose, portanto respostas ansiogênicas não eram esperadas. Ainda, o tratamento

crônico foi capaz de reverter o efeito ansiogênico do treinamento físico. Sabidamente, a cafeína atua sobre o metabolismo muscular, gera maior capacidade e diminuição da fadiga (Roy et al., 1994). As respostas observadas podem ser resultado da ação da cafeína em diminuir a fadiga provocada pela carga de trabalho inerente a atividade.

Entre os efeitos produzidos pela cafeína, está a habilidade de realçar a atividade motora. A atividade motora pode ser facilmente medida e controlada por circuitos cerebrais relativamente bem caracterizados. Por estas razões, as mudanças na locomoção são representadas pela propriedade estimulante da cafeína, e no seu mecanismo de ação (Fisone et al., 2004). Estudos em roedores mostram aumento da atividade locomotora devido ao efeito estimulante da cafeína (Snyder et al., 1981; Svenningsson et al., 1997). Em contrapartida, doses agudas de cafeína (25 mg/kg i.p.) diminuíram a atividade locomotora, determinando sintomas depressivos, que são efeitos gerados pelo bloqueio do receptor de  $A_{2A}$  de adenosina (Ledent et al., 1997).

A cafeína apresenta diversas influências no comportamento, entre elas o aumento no estado de alerta, motivação para trabalhar e eficiência (Fredholm et al., 1999). Os efeitos da cafeína no aprendizado, na memória e na coordenação estão relacionados à ação dessa metilxantina no alerta, na vigilância e na fadiga (Nehlig et al., 1992). O tratamento crônico com cafeína causa uma diminuição na atividade locomotora (Nikodijevic et al., 1993), enquanto que o tratamento agudo com moderadas doses, estimula a atividade locomotora em roedores (Fredholm et al., 1993), mas altas doses também diminuem essa atividade.

Portanto, o efeito da cafeína sobre o perfil locomotor em animais parece apresentar respostas distintas. É provável que as variações de dose e a forma de

tratamento influenciem esse padrão comportamental, já que no presente estudo não verificamos alteração na locomoção dos camundongos. O exercício físico por si, também não alterou a atividade locomotora. De acordo, o perfil locomotor não costuma ser afetado pela atividade física ou sofre ligeira diminuição (Pang et al., 2006).

O exercício físico é uma forma específica de atividade física com característica estruturada e repetitiva com o objetivo de manter e/ou melhorar a forma física, as funções metabólicas e a saúde geral (Dishman et al., 2006).

Especificamente, sobre o SNC, os efeitos do exercício físico ganharam importância na última década e são foco de pesquisas tanto em humanos como em modelo animal. Os mecanismos relacionados aos efeitos benéficos do exercício físico compreendem uma série de eventos que favorecem o aumento da expressão e concentração de uma variedade de fatores neurotróficos.

A prática regular de exercícios físicos aeróbios pode produzir efeitos antidepressivos e ansiolíticos e proteger o organismo dos efeitos prejudiciais do estresse na saúde física e mental. Com isso pesquisas envolvendo estudos que relacionam aspectos psicobiológicos com a prática de exercícios físicos tem apresentado resultados promissores, principalmente no âmbito das reações emocionais a situações estressoras de medo que podem desencadear os transtornos de ansiedade (Salmon, 2001).

Com relação aos danos a biomoléculas, em nosso estudo observou-se que nas estruturas estudadas teve significativa alteração na formação de grupos carbonil em proteínas estriatais referente ao grupo de animais T-caf em relação ao grupo nT-cont a ao grupo T-cont (figura 4A). No entanto na degradação de sulfidrilas e da peroxidação de lipídeos (figura 4B e 4C, respectivamente) não se observou

diferença estatística entre os grupos. No córtex pré-frontal observou-se níveis iguais de carbonilação de proteínas e presença de sulfidrilas entre os grupos experimentais (figura 5A e 5B, respectivamente). Observamos na figura 5C um aumento na lipoperoxidação no grupo dos animais T-caf em relação ao grupo dos animais nT-caf e no grupo T-cont comprado ao nT-cont. Com relação à atividade das enzimas antioxidantes, no estriado não se observou alteração da atividade da CAT nos grupos avaliados (figura 6A). Já a cafeína ativou a SOD no estriado (figura 6B) apresentando um aumento significativo nos animais nT-caf quando comparados ao grupo nT-cont. A atividade das enzimas antioxidantes, no córtex pré-frontal demonstra que a atividade da CAT (figura 7A) foi similar entre os grupos, enquanto que no grupo dos animais T-caf houve aumento da sua atividade em comparação ao grupo dos animais T-cont (figura 7B).

Alguns estudos *in vitro* demonstram que a cafeína e seus metabólitos apresentam efeitos antioxidantes (Gómez-Ruiz et al., 2007; Shi et al., 1991). A cafeína inclusive é capaz de reagir com o radical hidroxila, o qual é gerado pela reação de Fenton (Shi et al., 1991), na qual peróxido de hidrogênio reage com o ferro e também na reação de Haber Weiss onde o peróxido de hidrogênio reage com o ânion superóxido (Haber e Weiss, 1934). A maioria dos estudos sobre a cafeína e estresse oxidativo foram feitos *in vitro*, mas estudos feitos *in vivo* sugerem que a cafeína pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (Mukhopadhyay et al., 2003; Rossowska & Nakamoto, 1994). Por outro lado, a ação neurotóxica desta substância não pode ser descartada. Entretanto em nosso estudo não se observou alterações significativas nas estruturas cerebrais estudadas, provavelmente pela adaptação das células nervosas ao estímulo estressor do treinamento. Estudos também mostram que a cafeína e os produtos do seu catabolismo, teobromina e

xantina exibem tanto propriedades antioxidantes (Gómez-Ruz et al., 2007; Azam et al., 2003) quanto pró-oxidantes, demonstrada pela quebra oxidativa do DNA *in vitro* (Azam et al., 2003).

Tanto em humanos como em animais, ainda existe uma grande dificuldade em estabelecer modelos de exercício ou treinamento físico que proporcionem benefícios à saúde mental. Os modelos voluntários utilizam rodas de correr (*running wheel*) e costumam gerar benefícios sobre a saúde mental, no entanto por ser voluntário, o controle das variáveis de treinamento não é possível (Raglin, 1990). Nos modelos forçados aplicados freqüentemente em piscina ou esteira, as variáveis de treinamento podem ser controladas cuidadosamente. Apesar disso, há evidências de que esse tipo de treinamento gera sobrecarga emocional excessiva. Portanto, um cuidado com detalhes metodológicos deve ser tomado no sentido de extinguir ou minimizar possíveis estressores (Dishman, 2006). Para se protegerem contra a oxidação, os organismos contam com mecanismos químicos e enzimáticos (Yu, 1994). O principal sistema de defesa antioxidante é constituído por enzimas antioxidantes.

O exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e mecanismo de defesa antioxidante. Durante o exercício físico ocorrem várias reações químicas que implicam na formação dos EROS. Para proteger os tecidos contra possíveis danos causados pelos EROS, as enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPx/GR, parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de indivíduos treinados (Avula & Fernandes, 1999).

Por razões óbvias, muitos estudos envolvendo estresse oxidativo e exercícios têm sido conduzidos em modelos animais, especialmente o rato. Contudo,

esses estudos são passíveis de erros, pois poucos associam as variáveis metabólicas com a intensidade do esforço nesses animais (Prada et al., 2004).

O fornecimento de adenosina trifosfato (ATP) para a manutenção do exercício pode ser proveniente dos metabolismos aeróbio e anaeróbio. Durante o exercício moderado, as respostas fisiológicas estabilizam-se rapidamente e o oxigênio supre de maneira satisfatória a demanda energética. Em intensidades mais elevadas, a via metabólica predominante é a anaeróbia, o que resulta na redução abrupta do pH muscular em consequência da produção de lactato. Isso dificulta a manutenção do exercício por tempo prolongado, já que ocorre a inibição da atividade enzimática e redução da atividade do  $\text{Ca}^{++}$  a troponina (McArdle et al., 1998).

Modelos animais fornecem condições apropriadas para a obtenção de resultados referentes a mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas adaptações metabólicas ao exercício, que não seriam possíveis de outra forma. São raros ainda, na literatura, estudos que relacionam a ingestão de cafeína e estresse oxidativo à intensidade do esforço durante o exercício em ratos (Prada et al., 2004).

Acredita-se que a cafeína possua mecanismos de ação central e periférica que podem desencadear importantes alterações metabólicas e fisiológicas, resultando na melhoria do desempenho físico (Altimari et al., 2001). É similar na estrutura a diversos metabólicos endógenos, cruza a barreira hemato-encefálica e a placenta, e é distribuída no líquido intracelular (Arnaud, 1987). Estas propriedades permitem que a cafeína afete muitos tecidos humanos, incluindo o SNC, o sistema cardiovascular, e o músculo esquelético (Hardman, 1996).

Segundo Spriet (1995), existem pelo menos três teorias que podem tentar explicar o efeito ergogênico da cafeína durante o exercício físico. A primeira envolve

o efeito direto da cafeína em alguma porção do sistema nervoso central, afetando a percepção subjetiva de esforço e/ou a propagação dos sinais neurais entre o cérebro e a junção neuromuscular. A segunda teoria pressupõe o efeito direto da cafeína sobre co-produtos do músculo esquelético. As possibilidades incluem: alteração de íons, particularmente sódio e potássio; inibição da fosfodiesterase (PDE), possibilitando um aumento na concentração de adenosina monofosfato cíclica (AMPc); efeito direto sobre a regulação metabólica de enzimas semelhantes às fosforilases (PHOS); e aumento na mobilização de cálcio através do retículo sarcoplasmático, o qual contribui para o potencialização da contração muscular. A terceira teoria diz respeito ao aumento na oxidação das gorduras e redução na oxidação de carboidratos (CHO). Acredita-se que a cafeína gera um aumento na mobilização dos ácidos graxos livres dos tecidos e/ou nos estoques intramusculares, aumentando a oxidação da gordura muscular e reduzindo a oxidação de carboidratos.

Concluimos, a partir do exposto, que baixas doses de cafeína usadas cronicamente em animais em treinamento físico prolongado em piscina previne os efeitos ansiogênicos do exercício sem significativas alterações celulares no estresse oxidativo. Isto se deve, provavelmente, a uma adaptação das células ao estímulo estressor do exercício físico.

## REFERÊNCIAS

- AEBI H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology** 105: 121-126. 1984.
- AGUIAR AS JR; TUON T; ALBUQUERQUE MM; ROCHA GS; SPECK AE; ARAÚJO JC; DAFRÉ AL; PREDIGER RD; PINHO RA. The exercise redox paradigm in the Down's syndrome: improvements in motor function and increases in blood oxidative status in young adults. **J Neural Transm** Sep 16. 2008.
- AKSENOV MY; MARKESBERY WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett** 20: 141-5. 2001.
- ALESSIO HM; HAGERMAN AE; FULKERSON BK. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Med Sci Sports Exerc** 32:1576-81. 1999.
- ALTIMARI LR; CYRINO ES; ZUCAS SM; BURINI RC. Efeitos ergogênicos da cafeína sobre o desempenho físico. **Paul J Phys Educ** 14:141-158. 2000.
- ALTIMARI LR; MORAES LA; TIRAPEGUI L; MOREAU LM. Caffeine and performance in anaerobic exercise. **Rev Bras Cienc Farm** 42(1). 2006.
- ARUOMA ED. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food Chem. Tox.** 7:671-683. 1994.
- AVULA RCP; FERNANDES G. Modulation of antioxidant and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. **Aging, Washington**, v.11, n.4, p.246-52, 1999.
- AZAM S; HADI N; KHAN NU et al. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Med Sci Monit** 9:325-330. 2003.
- BAMBER D; COCKERILL LM; CARROLL D. The pathological status of exercise dependence. **Br J Sports Med** 34(2): 125-132. 2000.
- BARBOSA LM. **Efeito da suplementação de cafeína e do exercício físico sobre os níveis de ansiedade em modelo animal**. Criciúma; 2007. [Trabalho de Conclusão do Curso de Nutrição da Universidade do Extremo Sul Catarinense].
- BARONE JJ ROBERTS HR. Caffeine consumption. **Fd Chem Tox** 34(1):119-129. 1996.
- BEHL C. Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy. **Subcell Biochem** 38:65-78. 2005.

- BLUMENTHAL JA; O'TOOLE LL; CHANG JL. Is running an analogue of anorexia nervosa? An empirical study of obligatory and anorexia nervosa. **JAMA** 252: 520-523. 1984.
- BOXTEL MP; PAAS FG; HOUX PJ; ADAM JJ; TEEKEN JC; JOLLES J. Aerobic capacity and cognitive performance in a cross-sectional aging. **Intern Med** 31:1306-9. 1992.
- BRACKEN MB; BRYCE-BUCHANAN C; SILTEN R; SRISUPHAN W. Coffee consumption during pregnancy. **N Engl J Med** 306 (25):1548-9. 1982.
- BROWN DR; MORGAN WP; RAGLIN JS. Effects of exercise and rest on the state anxiety and blood pressure of physically challenged college students. **J Sports Med Phys Fitness** 33(3): 300-305. 1993.
- BRUNDEGE JM; DUNWIDDIE TV. Modulation of Excitatory Synaptic Transmission by Adenosine Released from Single Hippocampal Pyramidal Neurons. **J Neurosci** 16(18): 5603-5612. 1996.
- BUDGETT R; NEWSHOLME E; LEHMANN M; SHARP C; JONES D; JONES T et al. Redefining the overtraining syndrome as the unexplained underperformance syndrome. **Br J Sports Med** 34(1): 67-68. 2000.
- CARLSSON S; ANDERSSON T; WOLK A; AHLBOM A. low physical activity and mortality in women: baseline lifestyle and health as alternative explanations. **Scand J Public Health** 5: 480-487. 2006.
- CARMELI E; LAVIAM G; REZNICK AZ. The role of antioxidant nutrition in exercise and aging. In: Radák Z (ed.) Free radicals in exercise and aging. **Champaign: human kinetics**. 73-115. 2000.
- CASTAGNE V; GAUTSCHI M; LEFEVRE K; POSADA A; CLARKE PGH. Relationships Between Neuronal death and The Cellular Redox Status Focus on the Developing Nervous system. **Progress in Neurobiology** S9: 397-423. 1999.
- CHAN SY; MANCINI GB; BURNS S; JOHNSON FF; BROZIC AP; KINGSBURY K; BARR S; KURAMOTO L; SCHULZER M; FROHLICH J; IGNASZEWSKI A. Dietary measures and exercise training Contribute to improvement of endothelial function and atherosclerosis even in patients given intensive pharmacologic therapy. **J Cardiopulm. Rehabil** 5: 288-293. 2006.
- CHAPMAN RF; STAGER JM. Caffeine Stimulates Ventilation in Athletes with Exercise-Induced Hypoxemia. **Med Sci Sports Exerc** 40: 1080-1086. 2008.

- CHEN YF; LI PL; ZOU AP. oxidative stress enhances the production and actions of adenosine in the kidney. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** 281: R1808-1816. 2001.
- CHILDS A; JACOBS C; KAMINSKI T; HALLIWELL B; LEEUWENBURGH C. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. **Free Radic Biol Med** 31: 745-753. 2001.
- CLARKSON PM. Nutritional ergogenic aids: caffeine. **Int J Sports Nutr** 3(1): 103-111. 1993.
- COOPER C; BALAMURALI TB; SELWOOD A; LIVINGSTON G. A systematic review of intervention studies about anxiety in caregivers of people with dementia. **Int J Geriatr Psych** 2006 "in press".
- COSKUN S; GONUL B; GUZEL NA; BALABANLI B. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the of chronically exercised rats. **Mol Cell Bioch** 1(2): 135-138. 2005.
- COSTILL DL; DALSKY GP; FINK WJ. Effects of caffeine ingestion on metabolism and exercise performance. **Med Sci Sports Exerc** 10(3): 155-158. 1978.
- COTE CG. Surrogates of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Med** 119:54-62. 2006.
- DAVIS JM; ZHAO Z; STOCK HS; MEHL KA; BUGGY J; HAND GA. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 284: R399–R404. 2003.
- DEVASAGAYAM TP; KESAVAN PC. Radioprotective and antioxidant action of caffeine: Mechanistic considerations. **Ind J ExperBiol** 134: 291-297. 1996.
- DISHMAN RK; BERTHOUD HR; BOOTH FW et al. Neurobiology of exercise. **Obesity** 14 (3). 2006.
- DIXON AK; GUBITZ AK, Sirinathsinghji DJS, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. **Br J Pharmacol** 118:1461-1468. 1996.
- DUMAN RS. Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism. **Neurobiol Aging** 1: 88-93. 2005.
- ERNEST C; OLSON AK; PINEL JP; LAM RW; CHRISTIE BR. Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis? **J Psych Neurosci** 2:84-92. 2006.

- FEOKTISTOV I; BIAGGIONI I. Adenosine A<sub>2B</sub> receptors. **Pharmacol Rev** 49:381-402. 1997.
- FISONE G; BORGKVIST A; USIELLO A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cell Mol Life Sci** 61: 857-872. 2004.
- FREDHOLM BB; BATTIG K; HOLMÉN J; NEHLIG A; ZVARTAU EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological reviews* 51(1): 83-133. 1999.
- GOMES MR; TIRAPÉGUI J. Relação de alguns suplementos nutricionais e o desempenho físico. **Arch Latino Am Nutr** 50(4): 317-329. 2000.
- GÓMEZ-RUIZ JA; LEAKE DS; AMES JM. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **J Agric Food Chem** 55: 6962-6969. 2007.
- GRAHAM TE; BATTRAM DS; DELA F; WL-SOHEMY A; THONG FSL. Does caffeine alter muscle carbohydrate and fat metabolism during exercise? **Appl Physiol Nutr Metab** 33:1311-1318. 2008.
- GRIFFITHS RR; EVANS SM; HEISHMAN SJ; PRESTON KL; SANNERUD CA; WOLF B; WOODSON PP. Low-dose caffeine physical dependence in humans. **J Pharmacol Exp Ther** 255: 1123-32. 1990.
- GUSZKOWSKA M. Effects of exercise on anxiety, depression and mood. **Psychiatria Polska** 38(4):611-620. 2004.
- HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press Inc. New York, 3<sup>rd</sup> edition. 1999.
- HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press Inc. New York, 3<sup>rd</sup> edition. 2000.
- HARRI M; LINDBLOM J; MALINEN M; LAPVETELÄINEN T; ESKOLA S; HELMINEN HJ. Effect of access to a running wheel on behavior of C57BL/6J mice. **Lab Anim Sci** 49: 401-405. 1999.
- HE Z; MA WY; HASHIMOTO T; BODE AM; YANG CS; DONG Z. Introduction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and Caspase 3 pathways. **Japanese Journal of Cancer Research** 63: 4396-4401. 2003.
- HEISHMAN, SJ; HENNING FIELD JE. Stimulus functions of caffeine in humans: relation to dependence potential. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 16: 273-287. 1992.
- HENNESSY EM; STEVINSON C; FOX KR. Preliminary study of the lived experience of exercise for cancer survivors. **Eur J Oncol Nurs** 2: 155-166. 2005.

- HETEM LA; GRAEFF FG. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu. 2004.
- HOEXTER MQ; ROSA PS; TUFIK S; MELLO LE. Consequences of Prolonged Caffeine Administration and Its Withdrawal on Pilocarpine – and Kainate – induced Seizures in Rats. **Epilepsia** 46: 1401-1406. 2005.
- IVY JL. Influence of caffeine and carbohydrate feedings on endurance performance. **Med Sci Sports Exerc** 11(1): 6-11. 1979.
- JI LL. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Rad Biol Med** 18: 1079-1086. 1995.
- JIANG ZY; WOOLLARD AC; WOLFF SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids** (10): 853-856. 1991
- JIMENEZ CC. Diabetes and exercise: the role of the athletic trainer. **J Athl Train** 4: 339-343. 1997.
- JOHANSSON B; AHLBERG S; VAN DER PLOEG I; BRENE S; LINDEFORS N; PERSSON H; FREDHOLM BB. Effect of long term caffeine treatment on A1 and A2 adenosine receptors binding and on mRNA levels in rat brain. **Navvyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 347: 407-414. 1993.
- JULIANO LM; GRIFFITHS RR. A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. **Psychopharmacology** 176: 1-29. 2004.
- KANG SH; LEE YA; WON SJ; RHEE KH; GWAG BJ. Caffeine – induced neuronal death in neonatal rat brain and cortical cell cultures. **Neuroreport** 13(15): 1945-1950. 2002.
- KLIEMAN L; HYDE S; BERRA K. cardiovascular disease risk reduction in older adults. **J Cardiovasc Nurs** 1: S27-39. 2006.
- KÖNIG D; BERG A. Exercise and oxidative stress: is there a need for additional antioxidants. **Österreichisches J. Für Sportmedizin** 3. 2002.
- KOURY CJ, DONANGELO MC. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr Campinas** 16: 433-441. 2003.
- LANCHA-JR. **Nutrição e metabolismo aplicado à atividade motora**. São Paulo: Atheneu. 2004.
- LAURIENTI PJ; FIELD AS; BURDETTE JH; MALDJIAN JA; YEN Y; MOODY DM. Dietary caffeine consumption modulates MRI measures. **Neuroimage** 17: 751-757. 2002.

- LEAF DA; KLEINMAN MT; HAMILTON M; BARSTOW TJ. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. **Med Sci Sports Exerc** 29: 1036-9. 1997.
- LEDENT C; VAUGEOIS JM; SCHIFFMANN SN; PEDRAZZINI T; EL YACOUBI M; VANDERHAEGHEN JJ; COSTENTIN J; HEATH JK; VASSART G; PARMENTIER M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2A receptor. **Nature** 388: 674-678. 1997.
- LEEUWENBURGH C; HOLLANDER J; LEICHTWEIS S; GRIFFITHS M; GORE M; JILL. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. **Am J Physiol** 272: R363-9. 1997.
- LEVINE RL; GARLAND D; OLIVER CN; AMICI A; CLIMENT I; LENZ AG; AHN BW; STADTMAN ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Meth Enzymol** 186: 464-478. 1990.
- LISTER RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology** 92: 180-185. 1987.
- LOPES JM; AUBIER M; JARDIM J; ARANDA JV; MACKLEM PT. Effect of caffeine on skeletal muscle function before and after fatigue. **J Appl Physiol** 54(5): 1303-1305. 1983.
- LOWRY OH; ROSEBOUGH NG; FARR AL; RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem** 193: 265-275. 1951.
- MAKRILAKIS K; KATSILAMBROS N. Prediction and prevention of type 2 diabetes. **Hormones** 1: 22-34. 2003.
- MATSUBARA LS; FERREIRA ALA. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil** 43(1): 61-8. 1997.
- MAZZEO RS; TANAKA H. Exercise prescription for the elderly: current recommendations. **Sports Med** 11:809-818. 2001.
- MCARDLE WD; KATCH FI; KATCH VL. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998.
- MCAULEY E; RUDOLPH D. Physical activity, aging, and psychological well-being. **J Aging Phys Act** 3:67-96. 1995.
- MICHE E; HERRMANN G; NOWAK M; WIRTZ U; TIETZ M; ZOLLER B; RADZEWITZ A. Effect of an exercise training program on endothelial dysfunction in diabetic and non-diabetic patients with severe chronic heart failure. **Clin Res Cardiol** 95: 117-124. 2006.

- MUKHOPADHYAY S; MONDAL A; PODDAR MK. Chronic administration of caffeine: effect on the activities of hepatic antioxidant enzymes of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. **Indian J Exp Biol** 41: 283-289. 2003.
- NEHLIG A; DAVAL JL; DEBRY G. Brain Res. **Brain Res Rev** 17: 139-170. 1992.
- NEHLIG A; DEBRY G. Caffeine and sports activity: a review, Int. **J Sports Med** 15:215-223. 1994.
- NIKODIJEVIC O; JACOBSON KA; DALY JW. **Pharmacol Biochem Behav** 44: 199-216. 1993.
- PALMER TM; STILES GL. Adenosinereceptors. **Neuropharmacology** 34: 683-694. 1995.
- PANG TY; STAM NC; NITHIANANTHARAJAH J; HOWARD ML; HANNAN AJ. Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in huntington's disease transgenic mice. **Neuroscience** 2: 269-284. 2006.
- PAPADOPOULOS MC; KOUMENIS IL; YUAN TY; GIFFARD RG. Increasing vulnerability of astrocytes to Oxidative Injury with Age Despite Constant Antioxidant Defenses. **Neuroscience** 82 (3): 915-925. 1998.
- PEREIRA B; COSTA ROSA LFB; SAFI DA; MEDEIROS MHG; CURI R; BECHARA EJJ. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. **Physiol Behav** 56: 1095-9. 1994.
- PIGOTT TA. Anxiety disorders in women. **Psychiatr Clin North Am** 26: 621-72. 2003.
- PINHO RA; ANDRADES ME; OLIVEIRA MR; PIROLA AC; ZAGO MS; SILVEIRA PC; DAL-PIZZOL F; MOREIRA JC. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell Biol Int** 30: 848-53. 2006.
- PORKKA-HEISKANEN T, ALANKO L, KALINCHUK A, STENBERG D. Adenosine and sleep. **Sleep Med Rev** 6(4): 321-32. 2002.
- POWERS KC; HOWELY TE. **Fisiologia do Exercício, Teoria e Ap.** Powers & Howley. 2000.
- PRADA FJA; VOLTARELLI FA; MACEDO DV; MELLO MAR. Indicadores de estresse oxidativo em ratos submetidos ao treinamento em natação. **Espaço Rev Port Ci Desporto** 4(2): 237-274. 2004.
- RADAK Z; CHUNG HY; GOTO S. Exercise and hormesis: Oxidative stress related

- adaptation for successful aging. An Hypothesis. **Biogerontology** 6: 71-5. 2005.
- RAGLIN JS. Exercise and mental health. Beneficial and detrimental effects. **Sports Med Ju** 9(6): 323-329. 1990.
- RAGLIN JS. Overtraining and staleness. Psychometric monitoring of endurance athletes. In: SINGER RB; MURPHEY M; TENNART LK. **Handbook of research on Sport Psychology**. New York: Mcmillan. 1993.
- ROSSOWSKA MJ; NAKAMOTO T. Effects of chronic caffeine feeding on the activities of oxygen free radical defense enzymes in the growing rat heart and liver. **Experientia** 50: 465-468. 1994.
- SALMON P. Effects of physical exercise on anxiety, depression and sensitivity to stress a unifying theory. **Clin Psychol Rev** 21(1): 33-61. 2006.
- SANTOS DL; MILANO ME; ROSAT R. Exercício físico e memória. **Rev Paul Ed Fís** 12: 95-106. 1998.
- SCHNEIDER CD; OLIVEIRA AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte** 10(4): 36-52. 2004.
- SCOTT MD; LUBIN BH; ZUO L; KUYPERS FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **J. Lab Clin Med** 118: 7-16. 1991.
- SENGUPTA N; MAJI D. Exercise in prediabetes. **J Indian Med Assoc** 11: 600, 602. 2005.
- SHI X; DALAL NS; JAIN AC. Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Food Chem Toxicol** 29: 1-6. 1991.
- SIEPMANN M; KIRCH W. Effects of caffeine on topographic quantitative EEG. **Neuropsychobiol** 45: 161-166. 2002.
- SILVA RS; HOFFMAN AS; LARA DR; BONAN CD. Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats. **Eur J Pharmacol** 509: (2-3): 155-9. 2005.
- SILVERMAN K; EVANS SM; STRAIN EC; GRIFFITH RR. Withdrawal syndrome after the double-blind cessation of caffeine consumption. **N Engl J Med** 327: 1109-1114. 1992.
- SINCLAIR CJD; GEIGER JD. Caffeine use in sports. A pharmacological review. **J Sports Med Phys Fit** 40(1): 71-79. 2002.
- SJODIN B; WESLING HE; APPLE S. Biochemical mechanisms for oxygen free

- radical formation during exercise. **Sports Med** 10: 236-254. 1990.
- SLAVIN N; JOENSEN HK. Caffeine and Sport Performance. **Phys Sports Med** 13:191-193. 1995.
- SNYDER SH; KATIMS JJ; ANNAU Z; BRUNS RF; DALY JW. Adenosine receptors and behavioral actions of methyl-xanthines. **Proc Natl Acad Sci USA** 78: 3260-3264. 1981.
- SPRIET LS. Caffeine and performance. **Int J SportsNutr** 5 (1):S84-99. 1995.
- SRISUPHAN W; BRACKEN MB. Caffeine consumption during pregnancy and association with late spontaneous abortion. **Am J Obstet Gynecol** 154(1): 14-20. 1986.
- STRECKER RE; MORAIRTY S; THAKKAR MM; PORKKA-HEISKANEN T; BASHEER R; DAUPHIN LJ; RAINNIE DG; PORTAS CM; GREENE RW; MCCARLEY RW. Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. **Behav Brain Res** 115: 183-204. 2000.
- SVENNINGSSON P; NOMIKOS GG; ONGINI E; FREDHOLM BB. Antagonism of adenosine A2A receptors underlies the feine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. **Neurosci** 79: 753-764. 1997.
- SWENSON KK; HENLU SJ; SHAPIRO AC; SCHOEDER LM. Interventions to prevent loss of bone mineral density in women receiving chemotherapy for breast cancer. **Clin J Oncol Nurs** 2: 177-184. 2005.
- TROUP GJ; WILSON GL; HUTTON DR; HUNTER CR. Free radicals in imitation coffee. **Med J Aust** 5-19, 149(11-12): 720-1. 1988.
- TURLEY KR; GERST JW. Effects of caffeine on physiological response to exercise in young boys and girls. **Med Sci Sports Exerc** 38: 520-526. 2006.
- YU BR; YOON BC; KIM SS; CHUN SL. Treadmill exercise increases cell proliferation in hippocampal dentate gyrus in alcohol intoxicated rats. **J Sports Med Phys Fitness** 43: 393-397. 2003.

# 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](#)