

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

**EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE CAFEÍNA NA  
ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES,  
PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS E NA PRODUÇÃO DE  
RADICAIS LIVRES EM DIFERENTES REGIÕES DO  
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS ADULTOS**

FLUVIA MELINA ALVES JARDIM

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Deusa Aparecida Vendite

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau  
de Mestre em Ciências Biológicas - Bioquímica

Porto Alegre  
2005

“De nada adianta querer apressar as coisas; tudo vem ao seu tempo, dentro do prazo que lhe foi previsto. Temos pressa em tudo, aí acontecem os atropelos do destino, aquela situação que você mesmo provoca por pura ansiedade de não aguardar o tempo certo”.

Paulo Coelho

Este trabalho é dedicado a todos que durante estes anos me incentivaram a tentar e conquistar, especialmente à minha mãe, pelo exemplo de força e persistência e por ter me ensinado a jamais desistir de meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, aos meus pais, irmãos e ao meu sobrinho Maurício que, mesmo distantes sempre me deram amor e incentivo.

À minha amiga Liane por ter me incentivado a fazer mestrado e me trazido para este Departamento.

Ao Professor Perry e colegas do Lab. 25 que me receberam com muito carinho, laboratório do qual até hoje me sinto fazer parte.

À minha orientadora Deusa pela orientação, confiança e pela oportunidade ao receber no grupo após longo tempo afastada do meio acadêmico. Espero ter correspondido.

Ao Marcelo Ganzella, meu colega de todas as horas, com quem pude contar incondicionalmente, inclusive nos finais de semana e que sem a sua colaboração meu trabalho de mestrado não teria se realizado.

Aos colegas dos Labs. 26 e 28, especialmente a Carina pela orientação na iniciação científica e a Lúcia Martini pela força, amizade e pelo indispensável café.

À Lúcia Almeida pelo coleguismo e pelas tardes de experimento no Campus do Vale, sempre de bom humor.

À professora Carla Dalmaz pelo carinho e pela disponibilidade sempre que precisei.

A todos os colegas do Lab. 33, especialmente ao Leonardo e a Fernanda pelo auxílio nos trabalhos com estresse e quimioluminescência.

Ao LACEN pela liberação de horário e às colegas da Seção de Biologia Molecular: Daniela, Marilda e Linda pela amizade e compreensão.

A todas as pessoas do Departamento de Bioquímica da UFRGS (professores, alunos e funcionários) que de alguma forma colaboraram para a realização desta tese.

## Resumo

Estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a capacidade de defesa do sistema antioxidante endógeno. Sabe-se também que o acúmulo extracelular de aminoácidos excitatórios leva a uma exacerbada estimulação de seus receptores, provocando insultos oxidativos no cérebro e pode levar a uma série de eventos que podem ser os causadores de diversas patologias como isquemia e doenças neurodegenerativas. A adenosina, ao ligar-se aos seus receptores, age como neuromoduladora da liberação desses neurotransmissores, protegendo as células contra o estresse oxidativo. Além disso, sabe-se que a ativação de receptores de adenosina promove um aumento da atividade de enzimas antioxidantes.

A Cafeína tem sua principal ação farmacológica através do antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina, causando o bloqueio dos mesmos, e neste caso leva ao acúmulo de neurotransmissores no meio extracelular. Entretanto em altas concentrações, ela pode, por si só, ter ação antioxidante, “seqüestrando” radicais livres e, desta maneira, protegendo a célula do dano oxidativo. Por outro lado, alguns estudos demonstram que ela também pode ter ação pró-oxidante, quando em presença de altas concentrações de íons cobre e pode ter ação pró-apoptótica, via ativação da caspase 3.

O objetivo deste trabalho foi a caracterização do efeito da ingestão crônica de cafeína (1g/L) por 7 dias, sobre a atividade de enzimas de defesa antioxidantes (CAT, GSH-Px, SOD) em homogenato de hipocampo, cerebelo e estriado de ratos Wistar adultos. Nós também medimos a produção de radicais livres e a peroxidação de lipídeos.

Os resultados obtidos demonstraram que cafeína, administrada cronicamente, causa um aumento na peroxidação dos lipídeos de membranas e uma diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px, nas três estruturas analisadas quando comparadas ao controle, porém não foi

observada alteração na atividade da catalase. Além disso, não encontramos alteração nos níveis de produção de radicais livres. Portanto, embora alguns trabalhos demonstrem que a ingestão crônica de cafeína pode ter uma ação neuroprotetora, em nosso trabalho nós demonstramos que cafeína pode potencialmente provocar dano celular em estruturas cerebrais através da diminuição das enzimas antioxidantes. Provavelmente, esse efeito seja devido a uma diminuição da expressão e/ou número de receptores de adenosina ( $A_1$  ou  $A_2$ ) ou a cafeína está agindo somente como antagonista competitivo, bloqueando a ação da adenosina endógena. Outros experimentos são necessários para comprovar esta hipótese.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
I.1 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio .....	1
I.1.1 Definição .....	1
I.1.2 Efeitos fisiológicos .....	2
I.2 Estresse Oxidativo .....	4
I.3 Defesas Antioxidantes .....	5
I.3.1 Defesas antioxidantes enzimáticas .....	5
I.3.1.1- SOD: .....	5
I.3.1.2 CAT: .....	6
I.3.1.3 GSH-Px: .....	7
I.3.1.4 glutaciona redutase (GR): .....	7
I.3.2 Defesas antioxidantes não enzimáticas. ....	8
I. 4 Cafeína .....	8
I.5 Adenosina .....	10
I.6 Adenosina, Cafeína e Citoproteção. ....	12
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
III.1 Animais .....	17
III.2 Grupos Experimentais .....	17
III.3 Reagentes .....	18
III.4 Preparo dos Homogeneizados. ....	18
III.5 Dosagem de proteínas .....	18
III.6 Catalase .....	19
III. 7 Superóxido Dismutase (SOD) .....	20
III.8 Glutaciona Peroxidase (GSH-Px) .....	21
III.9 Diacetato de Difluoresceína (DCF) .....	22
III. 10 Medida de Peroxidação de lipídeos .....	23
III.11 Análise Estatística .....	25
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	26
IV. 1 - Glutaciona peroxidase – GSH-Px .....	26
IV. 2 – Superóxido dismutase – SOD .....	27
IV. 3 – Catalase – CAT .....	28
IV. 4 - Lipoperoxidação – LPO .....	29
IV. 5 – Diacetato de fluoresceína - DCF .....	30
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>VI. CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1:** Espécies reativas de oxigênio.....02

**Tabela 2:** Valores de produção de MDA, radicais livres e atividade das enzimas SOD, GSH-Px e CAT.....31



## ÍNDICE DE REAÇÕES

<b>Reação 1:</b> Reação de Haber-Weiss (com cobre <u>ou</u> ferro).....	03
<b>Reação 2:</b> Reação de Fenton (com cobre <u>ou</u> ferro) .....	03
<b>Reação 3</b> Dismutação do radical superóxido catalisada pela SOD.....	06
<b>Reação 4</b> Decomposição do peróxido de hidrogênio catalisada pela CAT.....	06
<b>Reação 5</b> Redução do peróxido de hidrogênio catalisada pela GSH-Px .....	07
<b>Reação 6</b> Conversão de glutatona oxidada (GSSG) em glutatona reduzida (GSH).....	07

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estrutura da cafeína .....	08
<b>Figura 2</b> Provável mecanismo da ação antioxidante da cafeína .....	15
<b>Figura 3</b> Princípio do Método de dismutação do radical superóxido( $O_2^{\bullet-}$ ) catalisada pela SOD, utilizado no Kit comercial RANSOD da Randox.....	21
<b>Figura 4</b> Efeito do tratamento crônico com cafeína sobre a atividade da GSH-Px.....	26
<b>Figura 5</b> Efeito do tratamento crônico com cafeína sobre a atividade da SOD.....	27
<b>Figura 6</b> Efeito do tratamento crônico com cafeína sobre a atividade da CAT.....	28
<b>Figura 7</b> Efeito do tratamento crônico com cafeína sobre a atividade da peroxidação de lipídeos (LPO).....	29
<b>Figura 8</b> Efeito do tratamento crônico com cafeína sobre a produção de ERO (DCF).....	30
<b>Figura 9</b> Resumo esquemático dos efeitos da cafeína sobre as enzimas antioxidantes (SOD, GSH-Px e CAT), peroxidação de lipídeos (LPO) e produção de radicais livres (DCF).....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AC – adenilato ciclase  
ADA – adenosina deaminase  
ADP – adenosina di- fosfato  
AMPc – monofosfato de adenosina cíclico  
ATP – adenosina tri-fosfato  
CAT – catalase  
DCF– diacetato de difluoresceína  
DNA – ácido desoxirribonucléico  
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético  
GABA<sub>A</sub> – ácido  $\gamma$  -aminobutírico  
GSSG – glutationa oxidada  
GSH-Px –glutationa peroxidase  
HO<sup>-</sup> – ânion hidroxila  
HO<sup>•</sup> – radical hidroxila  
LTP – depressão de longa duração  
MDA – malondialdeído  
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)  
NGF – fator de crescimento neural  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – ânion superóxido  
PBS – tampão salina/ fosfato  
RO<sup>•-</sup> – radical alcóxil  
SDS –dodecil sulfato de sódio  
SOD – superóxido dismutase  
TBA – ácido tiobarbitúrico  
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
Triton - X100 – éter octilfenólico do decaetilenoglicol  
U – unidade (atividade enzimática)  
XOD – xantina oxidase

# I. INTRODUÇÃO

## I.1 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio

### I.1.1 Definição

Radicaís livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) estão continuamente sendo produzidas como parte de processos metabólicos (URSO & CLARKSON, 2003).

Radical livre compreende toda estrutura química capaz de apresentar orbitais contendo um ou mais elétrons desemparelhados (CASTAGNE et al., 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; EVANS, 2000), os quais conferem ao radical livre uma grande capacidade de reagir com moléculas alvo.

Espécies reativas de oxigênio é um termo coletivo que engloba radicaís livres e “não radicaís” (que não possuem número ímpar de elétrons ou elétrons desemparelhados) derivados de oxigênio. Entretanto, esses não radicaís também são capazes de reagir com moléculas alvo, portanto sua ação pode ser tão prejudicial quanto à ação dos próprios radicaís livres (MENEGHINI, 1987; CASTAGNE et al., 1999; MATÉS, 2000; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

As ERO incluem radicaís livres oxigenados e compostos “não radicaís” de alta reatividade contendo átomos de oxigênio (Tab. 1).

Radicais	Não Radicais
Ânion superóxido ( $O_2\bullet^-$ )	Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )
Radical hidroxila ( $OH\bullet$ )	Ac. Hipocloroso ( $HOCl$ )
Radical Peroxil ( $RO_2\bullet$ )	Ozônio ( $O_3$ )
Radical Alcoxil ( $RO\bullet$ )	Oxigênio Singlet
Hidroperoxil ( $HO_2\bullet$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )

**TABELA 1:** Espécies reativas de oxigênio

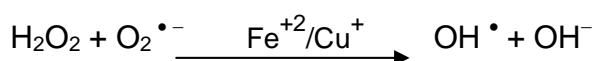
### I.1.2 Efeitos fisiológicos

O envolvimento das espécies reativas de oxigênio nas causas de dano e morte celular é cada vez mais reconhecido. Os radicais superóxido e hidroxila, quando associados com o aumento de processos peroxidativos e ligados a baixas concentrações de antioxidantes, estão envolvidos em um grande número de doenças degenerativas. (MATÉS, 2000).

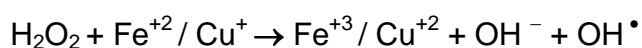
Por serem espécies em constante estado de transição, devido a sua alta reatividade química, as ERO podem reagir com molécula biológicas como lipídeos de membrana, ácidos graxos e fosfolipídeos, transformando este em um radical secundário, podendo iniciar assim um processo vicioso muito nocivo para a célula (CASTAGNE et al., 1999; EVANS, 2000). Quando essas moléculas biológicas são provenientes da membrana lipídica, pode haver uma peroxidação dos lipídeos de membrana e oxidação de algumas enzimas, levando a intensa oxidação de proteínas até sua degradação (MATÉS, 2000). Porém, quando esses radicais reagem entre si, este processo oxidativo é interrompido (CASTAGNE et al., 1999; EVANS, 2000). Portanto, são geralmente consideradas espécies danosas para as células, embora a fisiologia celular normal envolva a contínua produção de

radicais livres, principalmente derivados da cadeia respiratória mitocondrial (CASTAGNE et al., 1999).

O radical hidroxila é a mais temível das ERO, pois é o radical livre mais reativo e não há enzima que catalise sua remoção. Por ser extremamente instável, não escolhe alvo e atacam qualquer estrutura biológica para se estabilizar, inclusive os lipídeos de membrana. Este radical pode ser formado pelas reações de Haber-Weiss ou de Fenton demonstradas nas reações 1 e 2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



**Reação 1:** Reação de Haber-Weiss (com cobre ou ferro)



**Reação 2:** Reação de Fenton (com cobre ou ferro)

Se por um lado altos níveis de ERO, associados a um ineficiente sistema de defesa antioxidante são prejudiciais ao organismo podendo levar ao estresse oxidativo, por outro lado, baixos níveis de ERO podem ser indispensáveis para vários processos, agindo como mensageiros intracelulares e levando, entre outras coisas, à proliferação ou a apoptose (MATÉS & SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999). Além da respiração mitocondrial, há outras fontes fisiológicas de produção de radicais livres tais como: fagocitose, enzimas cicloxigenases e lipoxigenases, citocromos P-450 e a enzima xantina oxigenase (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

## I.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo descreve o estado celular em que o mecanismo antioxidante não consegue manter o equilíbrio do conteúdo de radicais livres. Como consequência desse estresse, os constituintes celulares são rompidos e os radicais livres desencadeiam uma série de reações de forma descontrolada (CASTAGNE et al., 1999).

Desta forma, estresse oxidativo pode ser visto como consequência de uma diferença entre a produção de ERO e a habilidade da célula se defender contra esses radicais, o que pode levar à morte celular (CASTAGNE et al., 1999; EVANS, 2000). O estresse oxidativo está envolvido em muitas patologias agudas do sistema nervoso central (SNC) tais como; isquemia, trauma encefálico, excitotoxicidade e várias doenças neurodegenerativas (TAKUMA et al., 2004).

Alguns fatores determinam a vulnerabilidade do cérebro ao estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999):

- ❖ Alto transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  através de membranas neuronais; qualquer alteração neste fluxo pode gerar estresse oxidativo.
- ❖ Presença de aminoácidos excitatórios, que podem gerar estresse oxidativo.
- ❖ Alto consumo de oxigênio por unidade de massa de tecido
- ❖ Muitos neurotransmissores são moléculas auto-oxidáveis
- ❖ Várias áreas do cérebro contêm altas concentrações de ferro (por exemplo, a substância nigra, o núcleo caudado, o putamen e o *globus pallidus*)
- ❖ As membranas lipídicas neuronais contêm alta quantidade de ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada
- ❖ O metabolismo cerebral normal gera peróxido de hidrogênio; um exemplo disso é a oxidação da dopamina pela monoaminaoxidase (MAO)
- ❖ O cérebro possui baixos níveis de defesas antioxidantes
- ❖ Algumas células gliais (microglias), como os macrófagos, podem produzir  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  quando ativados.

## I.3 Defesas antioxidantes

A prevenção do estresse oxidativo é um processo essencial em todo o organismo aeróbico, pois pode causar dano ao DNA. O aumento da peroxidação de lipídeos associado à baixa proteção antioxidante pode levar a citotoxicidade, alergia, mutagenicidade e/ou carcinogenicidade (MATÈS, 2000). Para manter a produção de radicais livres em níveis que não tragam prejuízo para a homeostasia celular, o organismo lança mão de alguns sistemas de defesa, isto é, antioxidantes.

Um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas àquelas de um substrato oxidável (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA), impede ou atrasa significativamente a oxidação daquele substrato. A citoproteção contra radicais livres é promovida por um sistema de defesa que compreende antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos (PERES, 1994; BERGENDI et al, 1999).

### I.3.1 Defesas enzimáticas

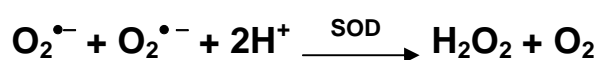
As defesas antioxidantes enzimáticas incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a glutathione reductase (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

#### I.3.1.1- SOD:

A SOD existe sob a forma de três isoenzimas nas células humanas: a) SOD citosólica, contendo íons cobre e zinco, b) SOD extracelular, contendo íons cobre e zinco e c) SOD mitocondrial, contendo íons manganês. Esta enzima remove, por reação de dismutação, o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que é um radical livre muito reativo, formado pela redução do oxigênio molecular. Durante a reação de



dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  há produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Reação 3). Esta ERO pode reagir com outro ânion superóxido e formar o poderoso radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), por isso deve ser rapidamente eliminado. As enzimas que catalisam a remoção do  $H_2O_2$  são a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GSH-Px) (MATÉS & SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



**Reação 3:** Dismutação do radical superóxido catalisada pela SOD.

#### I.3.1.2 CAT:

A catalase é uma enzima composta de quatro subunidades, cada uma contendo um grupamento heme. Nos eritrócitos pode proteger contra o  $H_2O_2$ , formado pela auto-oxidação da hemoglobina. Esta enzima catalisa diretamente a decomposição de  $2H_2O_2$  em duas moléculas de água e uma de oxigênio como demonstrado na reação 4 (MATES & SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



**Reação 4:** Decomposição do peróxido de hidrogênio catalisada pela catalase.

### I.3.1.3 GSH-Px:

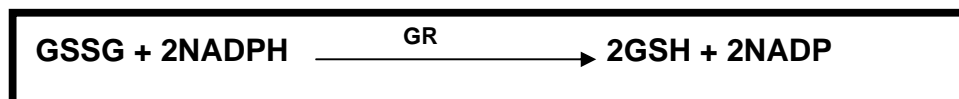
A glutationa peroxidase encontra-se presente em animais, plantas e muitas bactérias aeróbicas. Apresenta em sua estrutura quatro subunidades protéicas, cada uma contendo um átomo de selênio (Se), que é essencial para a atividade da enzima. Há dois tipos de GSH-Px uma que usa selênio como co-fator, que é encontrada na matriz mitocondrial e no citosol e outra selênio independente, que se encontra apenas no citosol e metaboliza exclusivamente hidroperóxidos orgânicos. Esta enzima catalisa a reação de remoção de vários hidroperóxidos (ROOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) através de sua redução a água com oxidação da glutationa reduzida (GSH) (Reação 5) e com isso protegendo as células de mamíferos contra o dano oxidativo (MATÉS et al., 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



**Reação 5:** Redução do peróxido de hidrogênio catalisada pela GSH-Px.

### I.3.1.4 glutaciona redutase (GR):

A glutaciona redutase complementa a ação da GSH-Px por converter glutaciona oxidada em sua forma reduzida (MAGGIRWAR et al., 1994).

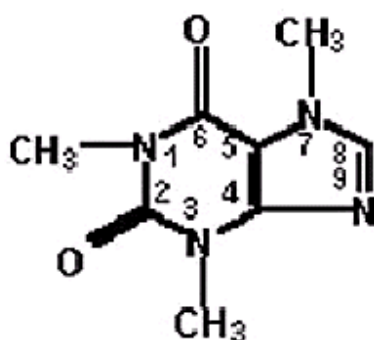


**Reação 6:** Conversão de glutaciona oxidada (GSSG) em glutaciona reduzida (GSH).

### I.3.2 Defesas não enzimáticas.

Dentre as defesas não enzimáticas encontram-se várias moléculas moléculas como o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -Caroteno e vitamina A que podem seqüestrar os radicais livres ou parar a propagação da reação em cadeia desses radicais. A glutatona (GSH), um tripeptídeo contendo grupamento tiol, é um eficiente antioxidante e também serve de co-fator para a enzima glutatona peroxidase (GSH-Px) (MATÉS et al., 1999; CASTAGNE et al., 1999).

## I. 4 Cafeína



**Figura 1:** Estrutura da cafeína

A cafeína (1,3,7 trimetil xantina) é a droga psicoativa mais usada no mundo. Além de ser considerada um estimulante leve, está presente em muitos alimentos e bebidas como café e chá. Em humanos, sua absorção se dá no trato gastrintestinal e em 99% dos casos é absorvida em um tempo de aproximadamente 45 minutos após a ingestão (FREDHOLM et al., 1999), sendo principalmente metabolizada no fígado para a forma de dimetil e

monometilxantina, os quais também apresentam atividade farmacológica (FREDHOLM et al., 1999; LEÓN et al., 2002).

A ação farmacológica da cafeína ocorre por meio de (1) antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina, (2) inibição de fosfodiesterases, (3) ativação de receptores de rianodina, um canal liberador de  $Ca^{2+}$  intracelular, (4) antagonismo de receptores GABA<sub>A</sub> (FREDHOLM et al., 1999; SOLINAS et al., 2002). Por outro lado, além de agir como estimulante no SNC (FREDHOLM et al., 1999; YAMATO, et al., 2002), há evidências de que a cafeína pode apresentar efeitos neurotóxicos por si só (He et al., 2003).

A cafeína altera a função de vários sistemas de neurotransmissores que contribuem para a regulação de processos cognitivos, estado emocional, padrão de sono, despertar e medo, esses efeitos são similares aos do estímulo de um estresse intenso ou de mudanças de humor ou desordens emocionais (CONCAS et al., 2000). Além disso, é usada como adjuvante analgésico em combinação com drogas como acetaminofem, aspirina e ibuprofeno. Esta ação analgésica se dá principalmente, por meio de antagonismo dos receptores de adenosina (DEVASAGAYAM et al., 1996; ABO-SALEM et al., 2004). Tem sido também, demonstrado que a administração oral de cafeína em ratos pode aumentar ou suprimir os efeitos das mutações induzidas por diferentes agentes mutagênicos físicos e químicos, podendo aumentar a expressão de genes supressores de tumores (AZAM et al., 2003).

A cafeína e seus metabólitos (principalmente a teofilina) parecem ter efeitos bifásicos em roedores e humanos, onde baixas doses têm ação estimulante na locomoção enquanto altas doses causam depressão (FREDHOLM et al., 1999). O uso crônico de cafeína pode causar tolerância para a ação estimuladora desta substância e parece que receptores de adenosina estão envolvidos nesta tolerância (SVENNIGSSON et al., 1999).

Os efeitos da cafeína têm sido estudados utilizando-se diferentes espécies de animais e tecidos, onde o uso crônico desta substância pode ou não induzir alterações na funcionalidade dos receptores de adenosina do tipo A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>. (FREDHOLM, 1999; LÉON et al., 2002). Alguns estudos têm demonstrado que o

uso crônico de cafeína promove um aumento na funcionalidade e/ou na expressão dos receptores A<sub>1</sub> de adenosina (GREEN & STILES, 1986; RAMKUMAR et al., 1988; SVENNIGSSON et al., 1999) em diversas regiões do cérebro, podendo inclusive levar ao desenvolvimento de tolerância ao uso desta substância (SVENNIGSSON et al., 1999). Por outro lado, uma diminuição na expressão destes receptores também tem sido observada pelo uso prolongado de cafeína ou teofilina (LEÓN et al., 2002).

## **I.5 Adenosina.**

A adenosina é um constituinte metabólito do sistema purinérgico, com duas ações no SNC: age como modulador homeostático e como neuromodulador sináptico, não sendo considerada neurotransmissor por não ser armazenada em vesículas.

Os níveis de adenosina no espaço extracelular são mantidos por sua liberação direta, através de transportadores bi-direcionais específico ligados à membrana plasmática e por sua formação através do catabolismo extracelular do ATP liberado (AGOSTINHO et al., 2000; REGO et al., 1997).

A liberação do ATP ocorre juntamente com outros neurotransmissores a partir de vesículas sinápticas (RAMKUMAR et al., 2001) ou após estimulação elétrica, como na depressão de longa duração (LTP), por agentes despolarizantes (CUNHA et al., 1996). Pela ação conjunta das enzimas ATP difosfohidrolase e ecto-5'-nucleotidase o ATP, ADP e AMP são degradados até adenosina (RAMKUMAR et al., 1995; MONS E COOPER, 1995). A regulação e/ou expressão da enzima ecto-5'-nucleotidase é crítica para a regulação dos níveis de adenosina (RAMKUMAR et al., 2001). Outra fonte de adenosina é o AMP cíclico (AMPc), o qual é liberado no espaço extracelular quando sua concentração intracelular aumenta devido a ativação de receptores acoplados positivamente à adenilato

ciclase (AC). No espaço extracelular o AMP cíclico é degradado a AMP pela ação de uma ecto-fosfodiesterase (RANKUMAR, 2000; MONS & COOPER, 1995).

A existência de transportadores bi-direcionais não concentradores para adenosina permite trocas nas suas concentrações intra e extracelulares e, com isso o excesso de adenosina no espaço extracelular pode ser rapidamente removido (CUNHA, 2001; RAMKUMAR et al., 2001). Em condições normais a adenosina captada é fosforilada pela enzima adenosina quinase à AMP e subseqüentemente a ATP. Em condições de estresse metabólico e/ou situações nas quais ocorre um grande aumento nos níveis de adenosina no espaço extracelular, essa enzima facilmente satura e, portanto, a adenosina extracelular é metabolizada a inosina pela enzima adenosina deaminase (ADA) (REGO et al., 1997; RAMKUMAR et al, 2001).

A adenosina age através de diferentes subtipos de receptores, denominados  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$  (SARANSAARI & OJA, 2003), acoplados, via proteína G heterotrimérica ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), a diferentes sistemas de segundo mensageiros (PALMER & STILES, 1995), incluindo adenilato ciclase, guanilato ciclase, fosfolipase C, fosfolipase  $A_2$ . Adenosina pode também alterar canais de cálcio ( $Ca^{+2}$ ) e potássio ( $K^+$ ) (KAISER & QUINN, 1999).

A ação neuromoduladora da adenosina se deve ao fato de que, dependendo do subtipo de receptor ativado, ela pode aumentar (receptor  $A_2$ ) ou diminuir (receptor  $A_1$ ) a liberação de outros neurotransmissores, inclusive aminoácidos excitatórios contribuindo assim para um aumento ou diminuição da atividade neuronal, respectivamente (PALMER & STILES, 1995). Além disso, tem sido demonstrada uma interação entre estes subtipos de receptores (uma célula pode apresentar ambos os subtipos de receptores): a ativação de receptores  $A_2$  inibe a ligação da adenosina aos receptores  $A_1$ . Portanto, quando as células são expostas a antagonistas específicos de receptor  $A_2$  prepondera a ação da adenosina nos receptores  $A_1$  (LOPES et al., 1999).

Em relação à localização no SNC, receptores  $A_1$  e principalmente  $A_{2A}$  são amplamente expressos em estriado (QUARTA et al., 2004). No córtex cerebral,

cerebelo, hipocampo e hipotálamo há uma maior incidência dos receptores A<sub>1</sub> (RAMKUMAR et al., 2001).

A adenosina, por sua importante ação moduladora na atividade neuronal, apresenta significantes propriedades neuroprotetoras (principalmente através da ativação de receptor A<sub>1</sub>), demonstrado em modelos de hipóxia, isquemia, excitotoxicidade e trauma, entretanto sua ação contra os efeitos deletérios das ERO sobre as células nervosas tem sido pouco estudada (ALMEIDA et al., 2003).

## **I.6 Adenosina, Cafeína e Citoproteção.**

O cérebro é especialmente suscetível ao dano oxidativo (HARRIS, 1992; CASTAGNE et al., 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). As espécies reativas de oxigênio são participantes-chaves das causas deste dano, entre outras coisas, por estarem envolvidos em processos neurodegenerativos, incluindo morte celular, doenças neuromotoras. Além disso, a disfunção de enzimas antioxidantes tem sido associada a doenças neurodegenerativas como mal de Alzheimer, doença de Huntington e doença de Parkinson (MATÉS, 2000). De um modo geral estas situações sempre apresentam um envolvimento dos aminoácidos excitatórios (OZAWA et al., 1998).

Vários trabalhos vêm demonstrando que a adenosina está envolvida na citoproteção do SNC. O mecanismo mais aceito para explicar esta ação neuroprotetora da adenosina envolve a ativação dos receptores A<sub>1</sub> de adenosina pré e pós-sinápticos, inibindo a liberação de neurotransmissores excitatórios (RAMKUMAR et al., 2001; CUNHA 2001). A administração aguda de agonistas para este subtipo de receptores tem sido largamente usada, pois reduz significativamente o dano celular. Resultados opostos são obtidos, quando estes agonistas são aplicados cronicamente, pois promovem uma dessensibilização dos receptores A<sub>1</sub>. Por outro lado, antagonistas de receptores A<sub>1</sub> de adenosina têm demonstrado uma ação neuroprotetora quando administrados cronicamente, pois

a prolongada administração pode levar a um aumento da funcionalidade dos receptores  $A_1$  (VON LUBITZ et al., 1994; JACOBSON et al., 1996).

Já a ativação dos receptores  $A_2$  aumenta a liberação dos neurotransmissores excitatórios (glutamato e análogos) e, portanto, pode levar a um aumento do dano celular (O'REGAN et al., 1992). Portanto, os antagonistas de receptores  $A_{2A}$  de adenosina têm sido considerados como sinalizadores do desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras, em particular para desordens neurodegenerativas, desde que eles não induzam a um aumento na expressão dos receptores  $A_2$ , quando administrados cronicamente (PINTOR et al., 2004).

Adenosina é liberada em diferentes tecidos sob condições de estresse oxidativo (REGO et al., 1997; MASINO et al., 1999; CHEN et al., 2001b). Além disso, tem sido também demonstrado que, quando estes tecidos submetidos a um estresse oxidativo são tratados com adenosina e/ou com agonista de seus receptores, apresentam uma significativa diminuição da peroxidação de lipídeos (YAVUZ et al., 1997; MAGGIRWAR et al., 1994), como também um aumento na recuperação do dano celular (ALMEIDA et al., 2003; MASINO et al., 1999).

Em experimentos onde se faz uso de tratamento com agentes quimioterápicos que levam à geração de ERO, pode ser observada a influência direta na expressão dos receptores  $A_1$ , através da ativação do  $NF\kappa\beta$  (um fator nuclear). Isto é, ERO podem aumentar a expressão de  $A_1$  por ativar o sistema de regulação de  $NF\kappa\beta$  neste gene e, desta forma, estimular a ação citoprotetora da adenosina (NIE et al., 1998).

Além disso, tem sido demonstrada a ação citoprotetora da ativação do receptor  $A_3$ , cujo efeito é exercido através da estimulação da atividade de enzimas antioxidantes celulares.

Experimentos com células basofílicas leucêmicas de rato (RBL-2H3) demonstram que a ativação dos receptores  $A_3$  de adenosina leva a um aumento na ativação das enzimas SOD, CAT, GSH-Px e glutatona redutase, além de uma diminuição da lipoperoxidação. Estes efeitos foram bloqueados por teofilina, um antagonista inespecífico de receptores de adenosina e metabólito da cafeína. Aumento similar na atividade destas enzimas é também observado em células

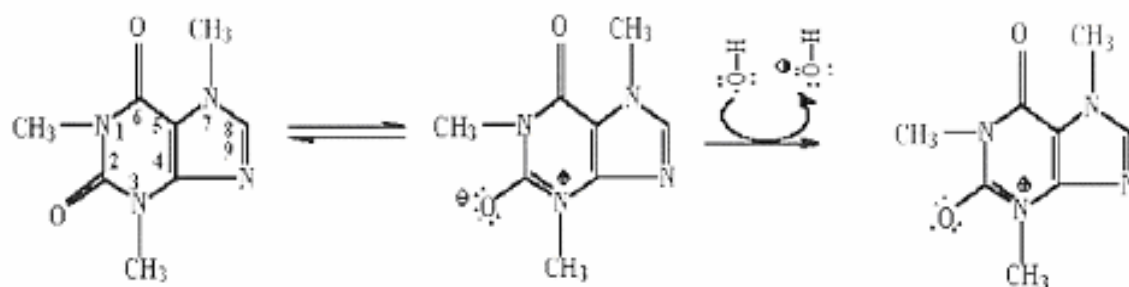


endoteliais, cardiomiócitos e células de músculo liso, mas nestes tecidos o aumento nas atividades das enzimas antioxidantes pode ser devido à ativação dos receptores  $A_1$  ou  $A_2$  de adenosina (MAGGIRWAR et al., 1994). Esta ação estimulatória parece envolver fosforilação das enzimas, mediada pela proteína quinase C, indicando que o mecanismo de fosforilação/defosforilação apresenta uma importante função na ativação dessas enzimas antioxidantes (MEI et al., 1999). Portanto, a ativação das defesas antioxidantes pela adenosina tem sido proposta como um novo mecanismo para ação neuroprotetora desta substância (RAMKUMAR et al., 2001).

O principal mecanismo de ação da cafeína no cérebro é por meio de um bloqueio não seletivo dos receptores de adenosina, principalmente dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ . Assim o tratamento agudo de animais com cafeína, por antagonizar os efeitos endógenos da adenosina, pode ser potencialmente citoprotetor (através do bloqueio de  $A_2$ ) ou citotóxico (através do bloqueio de  $A_1$ ) (FREDHOLM et al., 1999).

Como já comentado acima, tratamentos prolongados com agonistas dos receptores  $A_1$  de adenosina causam diminuição na funcionalidade e/ou expressão dos receptores  $A_1$  e acentuam o dano causado pelo episódio isquêmico, enquanto que ratos tratados cronicamente com cafeína podem apresentar um aumento na funcionalidade e/ou expressão de receptores  $A_1$  no cérebro, sendo mais resistentes à isquemia. (JACOBSON et al., 1996; RUDOLPHI et al., 1989).

Por outro lado, a cafeína e seus metabólitos, em altas concentrações (não fisiológicas), por sua habilidade de “seqüestrar”  $OH^\bullet$  e elétrons potencialmente danosos, parecem ter por si só atividade antioxidante na proteção de membranas contra o dano oxidativo causado por ERO (Fig. 2) (DEVASAGAYAM et al., 1996; LEE, 2000; AZAM et al., 2003). Porém, estas substâncias podem ligar-se a íons cobre, levando à redução de  $Cu^{2+}$  para  $Cu^{1+}$ , o qual em presença de oxigênio molecular ( $O_2$ ) podem levar a produção de ERO, conferindo a estas substâncias uma atividade pró-oxidante (AZAM et al., 2003).



**Figura 2:** Provável mecanismo da ação antioxidante da cafeína (AZAM et al., 2003).

Além disso, ao analisar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD Cu/Zn, CAT e GSH-Px) em fígado e coração de ratos de 22 e 30 dias de vida tratados com cafeína, foi observado que a cafeína somente aumentou a atividade da SOD Cu/Zn no coração (ROSSOWASKA & NAKAMOTO, 1994). No entanto, em células Jurkat T, a cafeína promoveu uma diminuição nos níveis basais da atividade da GSH-Px, apesar de que uma diminuição na peroxidação de lipídeos também foi observada (ERBA et al., 2003). Já em cérebro de ratos, foi demonstrado que a cafeína aumenta a peroxidação de lipídeos induzida por trauma encefálico (MOUTAERY et al., 2003).

No sistema nervoso, a ação da cafeína sobre o sistema de defesa antioxidante não tem sido devidamente avaliado, apesar das crescentes evidências do envolvimento da adenosina no estresse oxidativo.

## II. OBJETIVOS

Tendo em vista que:

1- a ativação de receptores de adenosina promove um aumento na atividade de enzimas antioxidantes em vários tipos celulares, o que vem sendo considerado como um novo mecanismo citoprotetor desta substância.

2- cafeína, substância largamente utilizada pela população em geral, é um antagonista destes receptores:

O objetivo deste trabalho é averiguar o efeito da ingestão crônica de cafeína sobre parâmetros oxidativos. Para tanto ratos Wistar adultos foram tratados com cafeína (1g/l) ou com água (controle) e após 7 dias foram sacrificados, as estruturas do SNC (hipocampo, cerebelo e estriado) foram retiradas e analisados os seguintes parâmetros:

- a) atividade da enzima de defesa antioxidante catalase
- b) atividade da enzima de defesa antioxidante glutathiona peroxidase e
- c) atividade da enzima de defesa antioxidante superóxido dismutase
- d) produção de radicais livres
- e) peroxidação de lipídeos

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### III.1 Animais

Foram utilizados 22 ratos machos Wistar de 60 dias de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. Os animais foram pesados, randomicamente separados e mantidos em caixas plásticas com 270 x 260 x 310 mm com assoalho recoberto com serragem (5 animais por caixa). Eles foram mantidos sob períodos de 12 horas luz e 12 horas escuro e sob temperatura de 22°C. Recebiam água ou solução de cafeína (1g/L) e ração à vontade.

#### III.2 Grupos Experimentais

Foram analisados dois grupos experimentais: animais tratados com água (grupo controle) ou com cafeína 1g/L dissolvida na água de beber (grupo cafeína) por 7 dias, tendo sido tratados 11 animais por grupo. Ao final do tratamento os animais foram sacrificados por decapitação. As três estruturas (hipocampo, cerebelo e estriado) foram rapidamente dissecadas (as meninges e sangue retirados), mantidas em solução tampão salina/fosfato (PBS) em pH 7,4 e pesadas, colocadas em frascos Eppendorf e congeladas em nitrogênio líquido até o momento das dosagens, com exceção da dosagem da catalase em que as amostras foram utilizadas imediatamente após a retirada das estruturas.

### **III.3 Reagentes**

Todos os padrões e reagentes foram obtidos das marcas Merck, Sigma ou Randox.

### **III.4 Preparo dos Homogeneizados.**

Para a Catalase as estruturas, recém dissecadas, foram diluídas em tampão fosfato de potássio 10mM (Tampão Catalase, pH 7,4) diluição 1:10 (p/v). As amostras foram sonicadas, centrifugadas a 3000g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para as dosagens. O sobrenadante sofreu uma etapa de extração onde a 200µl de sobrenadante foram adicionados 20µl de etanol (10%) e agitados no Vórtex. Incubou-se por 30 min no gelo e logo após foram adicionados 20µl de Triton X-100 (10%) e agitado novamente no vórtex (AEBI, 1984).

Para as outras dosagens (SOD, GSH-Px, produção de radicais livres (DCF) e Peroxidação de Lipídeos) as estrutura foram descongeladas, diluídas 1:10 (p/v) em Tampão Fosfato 50mM/EDTA 1mM em pH 7,4 e sonicadas, centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e mantido em gelo para posteriormente ser utilizado nas dosagens.

### **III.5 Dosagem de proteínas**

As proteínas foram dosadas pelo método de Peterson (1977), utilizando-se como padrão uma solução de albumina bovina de 1mg/mL.

### III.6 Catalase

A enzima catalase é altamente específica e possui atividade apenas para peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), hidroperóxidos de metila e etila.

Esta técnica baseia-se na medida da velocidade de consumo do peróxido de hidrogênio na amostra, onde a atividade da catalase (CAT) é diretamente proporcional à taxa de decomposição do  $H_2O_2$ . As leituras das absorvâncias são feitas em um comprimento de onda de 240nm, sendo este o comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda no qual foram realizadas as medidas.

#### Reagentes:

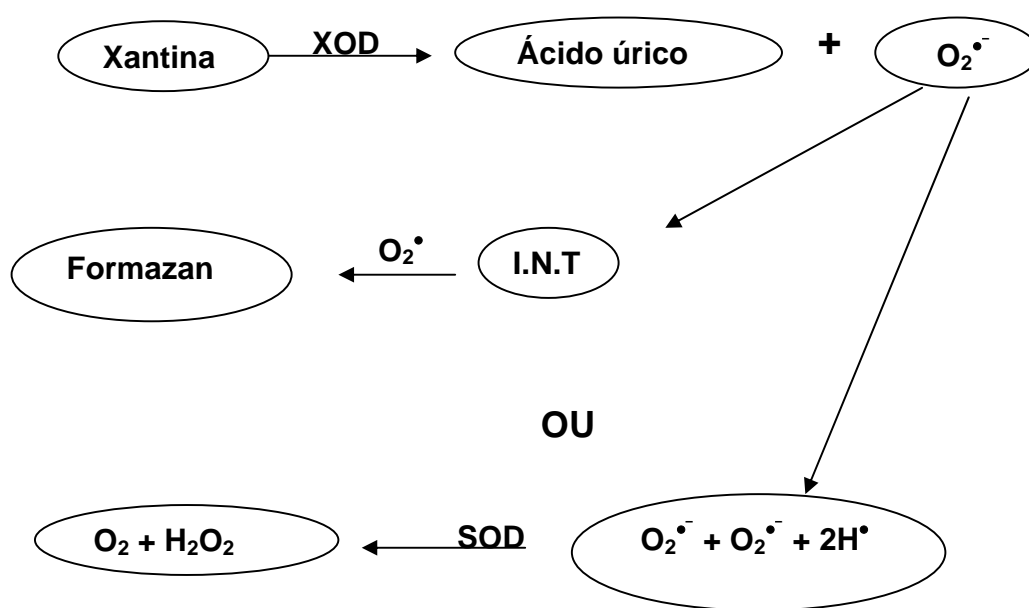
- 1) Tampão fosfato de Potássio a 10mM em pH 7,6
- 2) Tampão fosfato de potássio mais Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 30%.Concentração final  $H_2O_2$  18mM

Neste ensaio, 600 $\mu$ l da mistura do tampão fosfato com  $H_2O_2$  foram adicionados a 25 $\mu$ l do homogeneizado de amostra, o decaimento das absorvâncias foram monitorados espectrofotometricamente a 240nm por 4 min (AEBI, 1984). Para zerar o aparelho foram utilizados 600 $\mu$ l de tampão fosfato adicionados a 25 $\mu$ l do homogeneizado de amostra. A atividade enzimática foi calculada como U de CAT/mg proteína, porém os resultados foram expressos como percentual da atividade enzimática do grupo controle.

### III. 7 Superóxido Dismutase (SOD)

A função da SOD é acelerar a dismutação do radical tóxico superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) produzido durante o processo oxidativo energético do peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular.

Este método (RANSOD - Randox) emprega xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido, os quais reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4nitrofenol)-5-cloretos de feniltetrazol (I.N.T.) para formar o composto de coloração vermelha, o formazan. A atividade da SOD é medida através do grau de inibição desta reação (Fig. 3) (Kit RANSOD da Randox).



**Figura 3:** Princípio do Método de dismutação do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) catalisada pela SOD, utilizando o Kit comercial RANSOD – Randox, o qual emprega o sistema Xantina-Xantina oxidase, medindo a formação de um composto (Vermelho de formazan).

### Reagentes:

-Kit Ransod (Superóxido dismutase) da Randox composto de: Substrato misto (Xantina + I.N.T), Tampão, Xantina Oxidase, Padrão.

As dosagens das amostras foram processadas em duplicata, onde 170 $\mu$ l de substrato misto (xantina) foram adicionados sobre 5 $\mu$ l do homogeneizado de amostra, homogeneizados vigorosamente, incubados em placa de aquecimento a 37°C por 5 minutos. Ao final da incubação foram adicionados 25 $\mu$ l de xantina oxidase e após cronometrado 1minuto foi obtida a absorbância inicial, retornando a placa para o aquecimento, sempre ao abrigo da luz. Após 3 minutos foi obtida a absorbância final em um comprimento de onda de 505nm. A atividade enzimática foi calculada como U de SOD/mg proteína, porém os resultados foram expressos como percentual da atividade enzimática do grupo controle.

### **III.8 Glutationa Peroxidase (GSH-Px)**

A enzima glutaciona peroxidase (GSH-Px) catalisa a reação de vários peróxidos principalmente peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos. Para essa redução a GSH-Px utiliza o grupamento sulfidril da glutaciona reduzida (GSH) para formar glutaciona oxidada (GSSG), A forma reduzida (GSH) pode ser regenerada pela interação da GSSG com NADPH através da enzima glutaciona redutase. Desta forma a atividade da enzima GSH-Px pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH (HALLIWEL & GUTERIDGE, 1999).



### Reagentes:

- 1) Tampão de incubação (tampão fosfato de potássio 20mM/EDTA 1mM/azida 0,8 mM em pH 7,7). A azida tem a função de inibição da catalase.
- 2) NADPH 0,625mM
- 3) Glutathione (GSH) 40mM
- 4) Glutathione redutase (GR) 40 U/mL
- 5) Tert-butilidroperóxido 5mM

Neste ensaio 20 $\mu$ l de NADPH e 110 $\mu$ l de tampão de incubação foram adicionados a 30 $\mu$ l do homogeneizado das amostras e pré-incubou-se a 37°C por 10 minutos. Logo após, foi adicionado 10 $\mu$ l de glutathione reduzida e 10 $\mu$ l de glutathione redutase. Foram feitas as leituras da linha de base a 340nm por 4 minutos (de 20 em 20 segundos) mantendo-se a placa a 37°C. Adicionou-se 20 $\mu$ l de tert-butilidroperóxido e a seguir foi feita a leitura da atividade da GSH-Px a 340nm por 4 minutos (de 20 em 20 segundos) sob temperatura de 37°C (FLOHÉ & GUNZLER, 1984). Todas as leituras foram feitas no equipamento Espectromax. As dosagens foram realizadas em duplicata.

A atividade enzimática foi calculada como U de GSH-Px/mg proteína, porém os resultados foram expressos como percentual da atividade enzimática do grupo controle.

### **III.9 Diacetato de Difluoresceína (DCF)**

Este teste foi descrito pela primeira vez em 1965 como um ensaio fluorimétrico para peróxido de hidrogênio. Faz a conversão do composto não fluorescente diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) no composto fluorescente 2'-7' diclorofluoresceína. Várias espécies reativas de oxigênio e

espécies reativas de nitrogênio (incluindo  $\text{ONOO}^-$ ) podem oxidar o DCFH, não diferenciando quais espécies são detectadas. A oxidação do DCFH pelas células causa a fluorescência da difluoresceína, que pode facilmente ser visualizada (a fluorescência é emitida em 525nm com excitação de 488nm). Esta técnica é bastante utilizada como meio de determinação da produção de radicais livres em células vivas.

#### Reagentes:

- 1) DCFH-DA 0,2 mM
- 2) DCF 0,1 $\mu$ M

Neste ensaio 100 $\mu$ l de água e 75 $\mu$ l de DCFH-DA foram adicionados a 25 $\mu$ l de homogeneizado de amostra, homogeneizados em vórtex e levados ao banho-maria 37°C ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Separadamente, foi preparada a curva de calibração onde se utilizou como padrão o DCF 0,1 $\mu$ M diluído em tampão fosfato/EDTA em pH 7,4 em diferentes concentrações. Tanto as amostras quanto a curva foram processadas em duplicata e ao abrigo da luz. Ao final dos trinta minutos foram feitas as leituras no fluorímetro (525nm excitação e 488nm de emissão). Os resultados foram expressos em pmol de DCF produzido/mg de proteína (WANG & JOSEPH, 1999).

### **III. 10 Medida de Peroxidação de lipídeos**

As medidas de peroxidação de lipídeos foram feitas pelo método das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), uma das medidas mais amplamente utilizadas para este tipo de análise, que se baseia na reação de

aldeídos e outros compostos, em especial o malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação de lipídeos de membrana, com o ácido tiobarbitúrico (TBA).

Reagentes:

- 1) Ácido tricloroacético 10%
- 2) Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%
- 3) Butanol

Este ensaio foi baseado no método de BUEGE & AUST, (1978), em que 250µl de TCA 10% e 370µl de TBA 0,67% foram colocados sobre 125µl de homogeneizado de amostra. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados em banho-maria fervente (100°C), ao abrigo da luz, por um período de 30 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 750µl de Butanol, os tubos foram centrifugados a 3000g por 10 minutos e a fração lipídica (sobrenadante) foi utilizada nas dosagens. Ao final dos trinta minutos foram feitas as leituras das amostras no fluorímetro (515nm excitação e 553nm de emissão) contra um branco onde a preparação foi igual à dos tubos de amostra, somente utilizando-se o tampão fosfato/EDTA pH 7,4 no lugar do volume da amostra. Foi utilizado como padrão o 1,1,3,3 tetramethoxypropanol (TMP). Os resultados são expressos em nmóis de MDA/mg de proteínas.

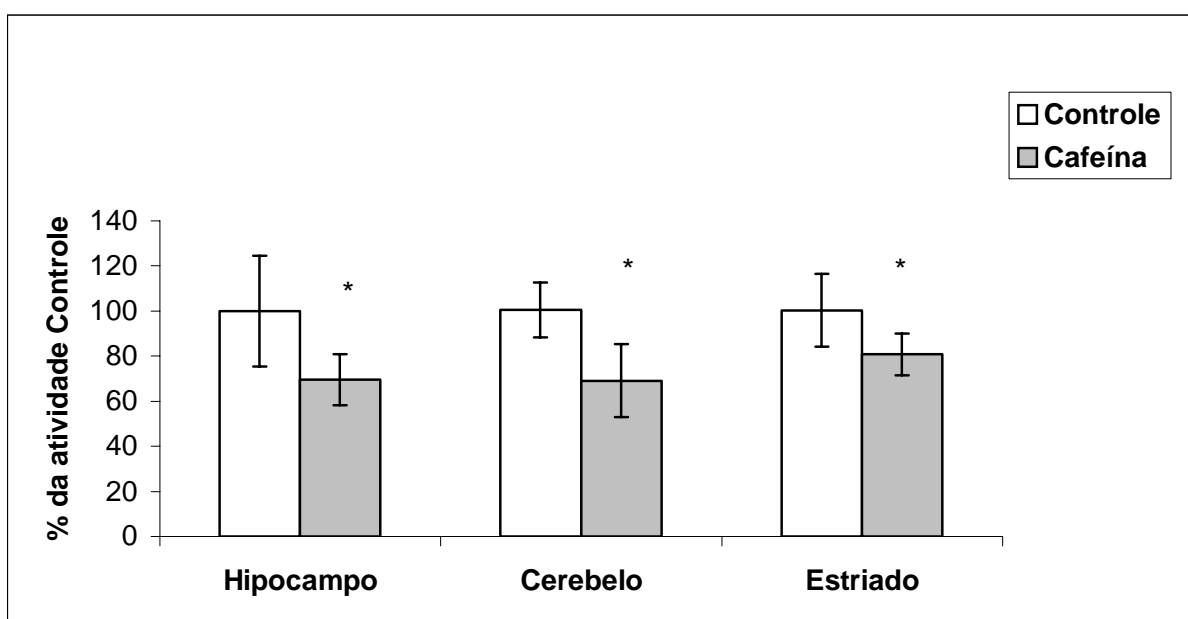
### **III.11 Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram analisados através do teste t-Student. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de determinações ensaiadas em duplicatas. Para todos os experimentos, um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## IV. RESULTADOS

### IV. 1 - Glutaciona peroxidase – GSH-Px

A medida de atividade da enzima antioxidante glutaciona peroxidase, em homogeneizado de estruturas do SNC, hipocampo (HP), cerebelo (CE) e estriado (ES), de ratos Wistar, após tratamento crônico (7dias) com cafeína (1g/L) ou água (Controle), apresentou diferença significativa entre os grupos controle e cafeína. O grupo cafeína apresentou uma menor atividade da GSH-Px, quando comparado com o respectivo controle (HP  $0,897 \pm 0,221$ ; CE  $1,20 \pm 0,144$ ; ES  $1,69 \pm 0,271$  - U de GSH-Px/mg de proteína  $\pm$  DP), nas três estruturas analisadas (Fig. 4 e Tab. 2).



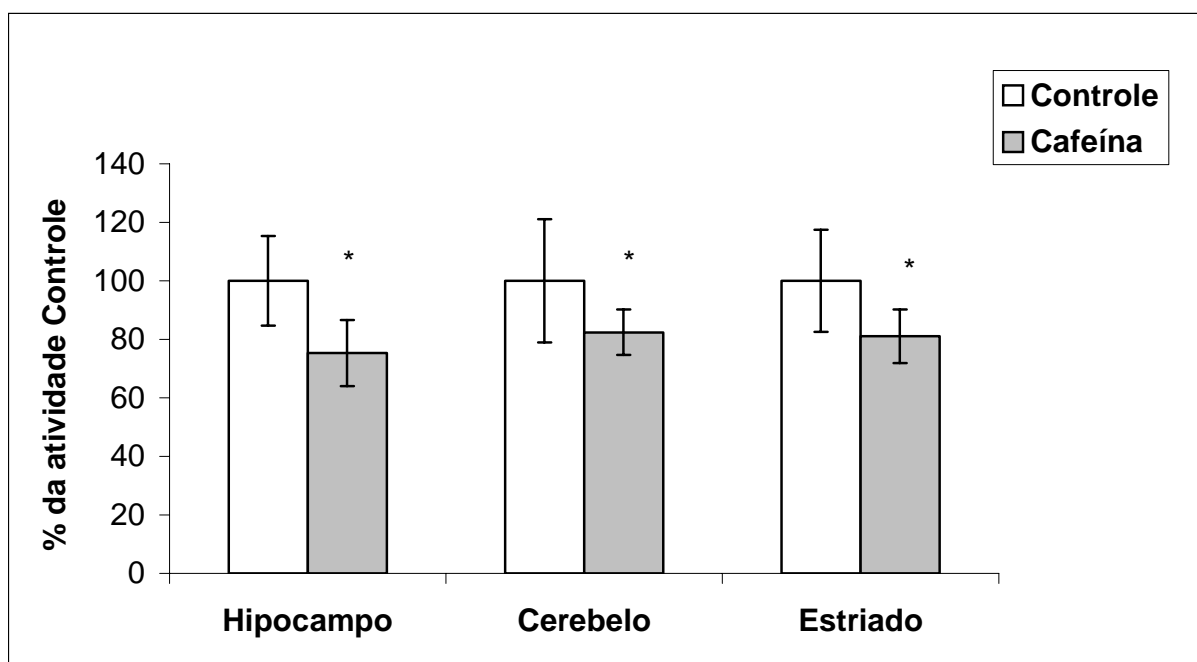
**Figura 4:** Atividade da enzima GSH-Px em diferentes estruturas do SNC de ratos.

Resultados expressos em porcentagem da atividade do controle.

\*- diferença significativa em relação ao controle da respectiva estrutura (teste t-Studente  $p < 0,05$ ). Hipocampo  $n=5$ , Cerebelo  $n=7$ , Estriado  $n=7$ .

## IV. 2 – Superóxido dismutase – SOD

A medida de atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase, em homogeneizado de estruturas do SNC, hipocampo (HP), cerebelo (CE) e estriado (ES), de ratos Wistar, após tratamento crônico (7dias) com cafeína (1g/L) ou água (Controle), apresentou diferença significativa entre os grupos controle e cafeína. O grupo cafeína apresentou uma menor atividade da SOD quando comparado com o respectivo controle (HP  $0,340 \pm 0,052$ ; CE  $0,325 \pm 0,069$ ; ES  $0,310 \pm 0,055$  – U de SOD/mg de proteína  $\pm$  DP), nas três estruturas analisadas (Fig. 5 e Tab. 2).

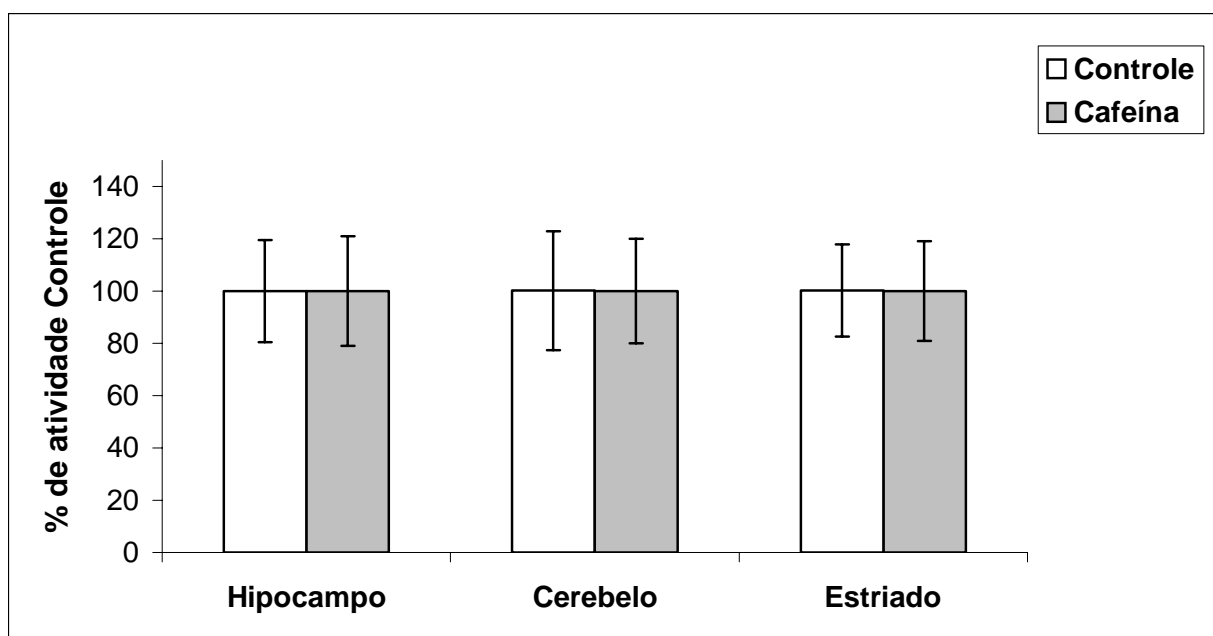


**Figura 5:** Atividade da enzima SOD em diferentes estruturas do SNC de ratos. Resultados expressos em porcentagem da atividade do controle.

\*- diferença significativa em relação ao controle da respectiva estrutura (teste t-Student  $p < 0,05$ ). Hipocampo  $n=6$ , Cerebelo  $n=8$ , Estriado  $n=8$ .

### IV. 3 – Catalase – CAT

A medida de atividade da enzima catalase, em homogeneizado de estruturas do SNC, hipocampo (HP), cerebelo (CE) e estriado (ES), de ratos Wistar, após tratamento crônico (7dias) com cafeína (1g/L) ou água (Controle), não apresentou diferença significativa entre os grupos controle (HP  $3,01 \pm 0,59$ ; CE  $3,56 \pm 0,81$ ; ES  $1,95 \pm 0,28$  -U de CAT/mg de proteína  $\pm$  DP) e cafeína nas três estruturas analisadas (Fig. 6 e Tab. 2).



**Figura 6:** Atividade da enzima CAT em diferentes estruturas do SNC de ratos.

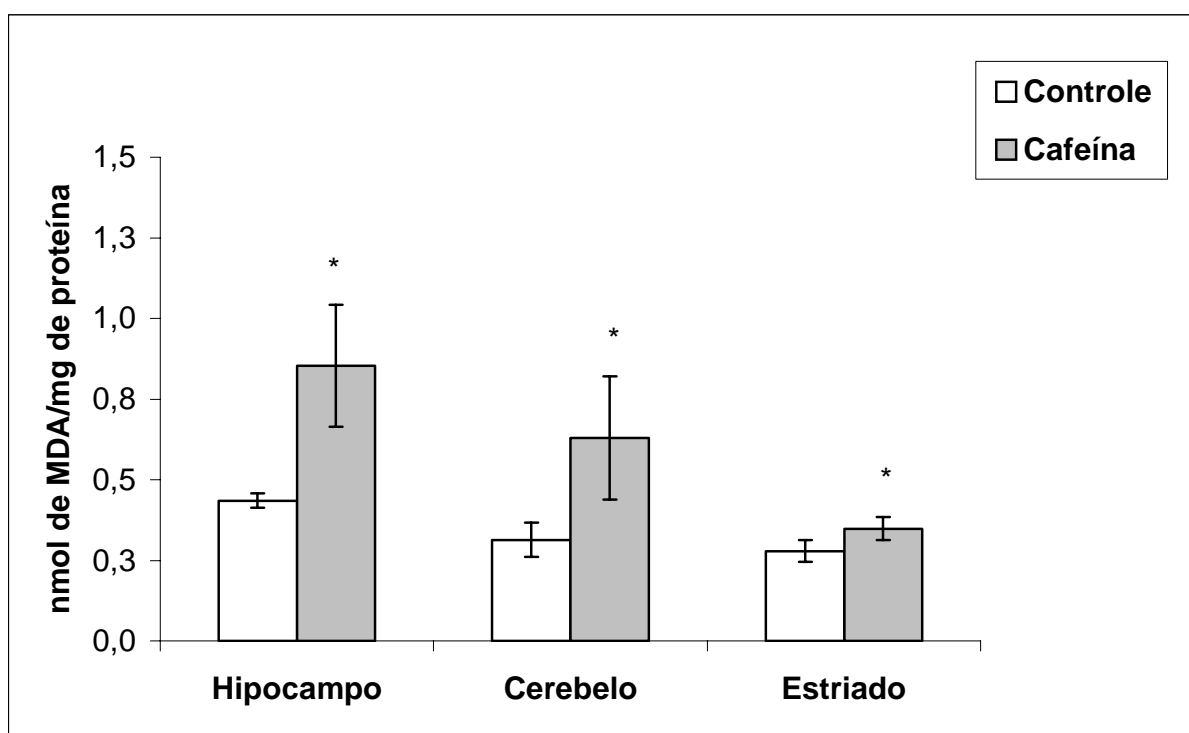
Resultados expressos em porcentagem da atividade do controle.

Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (teste t-Student  $p > 0,05$ ).

Hipocampo  $n=4$ , Cerebelo  $n=3$ , Estriado  $n=4$ .

#### IV. 4 - Lipoperoxidação – LPO

A Peroxidação de lipídeos, medida através da técnica do TBARS, em homogeneizado de estruturas cerebrais (hipocampo, cerebelo e estriado) de ratos Wistar, após tratamento crônico (7dias) com cafeína (1g/L) ou água (Controle), apresentou diferença significativa entre os grupos controle e cafeína. O grupo cafeína apresentou maior peroxidação de lipídeos quando comparado com o respectivo controle, nas três estruturas analisadas (Fig.7 e Tab. 2).



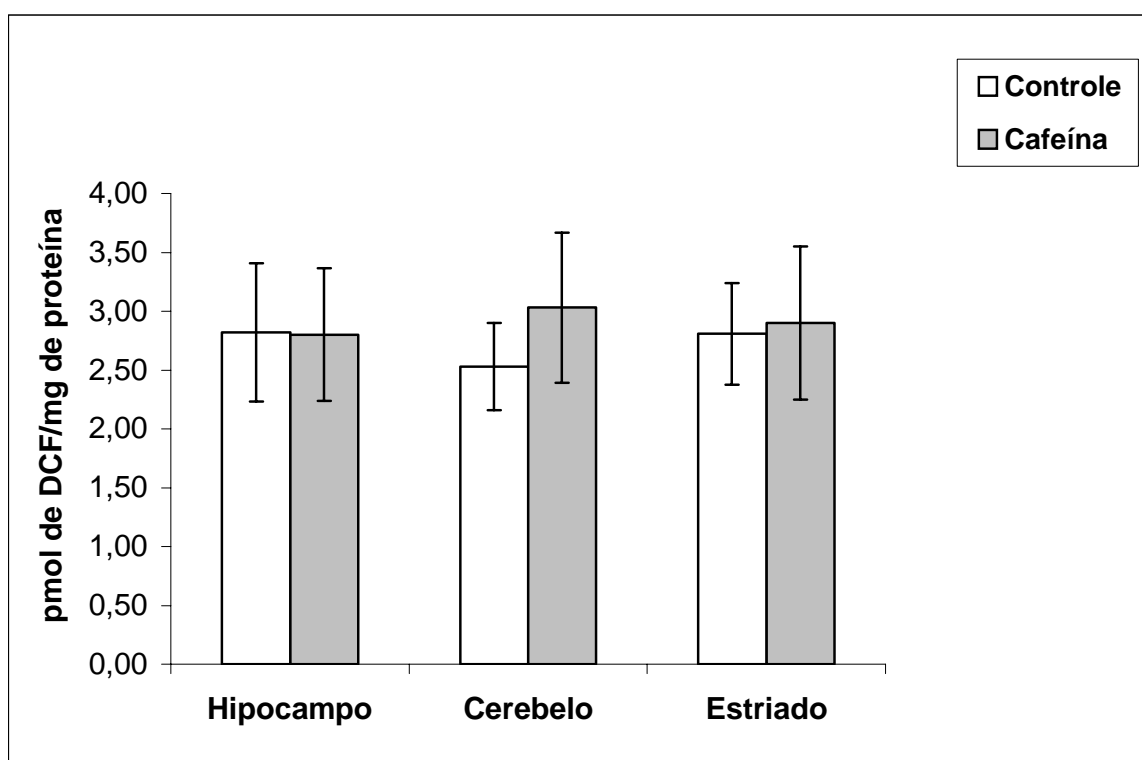
**Figura 7:** Lipoperoxidação em diferentes estruturas do SNC de ratos Resultados expressos em nmol de MDA/mg de proteínas.

\*- diferença significativa em relação ao controle da respectiva estrutura (teste t-Student  $p < 0,05$ ). Hipocampo  $n=3$ , Cerebelo  $n=3$ , Estriado  $n=4$ .



#### IV. 5 – Diacetato de fluoresceína - DCF

A medida de produção de ERO foi realizada através da dosagem de fluorescência do DCF, em homogeneizado de estruturas do SNC (hipocampo, cerebelo e estriado) de ratos Wistar, após tratamento crônico (7dias) com cafeína (1g/L) ou água (Controle), não apresentando diferença significativa entre os grupos controle e cafeína, nas três estruturas analisadas (Fig. 8 e Tab.2).



**Figura 8:** Valores de fluorescência do DCF representando a geração de ERO em diferentes estruturas do SNC de ratos.

Resultados expressos em pmol de DCF produzido/mg de proteína.

Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (teste t-Student  $p > 0,05$ ). Hipocampo  $n=11$ , Cerebelo  $n=9$ , Estriado  $n=11$ .

**Tabela 2:** Valores de produção de MDA, radicais livres e atividade das enzimas SOD, GSH-Px e CAT em animais que receberam água (controle) e animais que receberam cafeína (1g/L) na água de beber por 7 dias.

	Hipocampo		Cerebelo		Estriado	
	Controle	Cafeína	Controle	Cafeína	Controle	Cafeína
<b>SOD<sup>a</sup></b>	99,9 ± 15,3	75,3 ± 11,3*	100,0 ± 21,1	82,4 ± 7,8*	100,0 ± 17,5	81,0 ± 9,1*
<b>GSH-Px<sup>a</sup></b>	100,0 ± 24,6	69,6 ± 11,3*	100,6 ± 12,1	69,1 ± 16,2*	100,3 ± 16,2	80,8 ± 9,2*
<b>CAT<sup>a</sup></b>	100,0 ± 19,6	99,9 ± 25,7	100,6 ± 23,8	99,9 ± 20,0	99,9 ± 14,8	81,0 ± 16,3
<b>TBARS<sup>b</sup></b>	0,44 ± 0,02	0,85 ± 0,19*	0,31 ± 0,05	0,63 ± 0,19*	0,28 ± 0,03	0,35 ± 0,04*
<b>DCF<sup>c</sup></b>	2,82 ± ,59	2,8 ± 0,56	2,53 ± 0,37	3,03 ± 0,64	2,81 ± 0,43	2,90 ± 0,65

Os valores são expressos como Média ± desvio padrão

\* significativamente diferente do respectivo controle (p<0,05)

<sup>a</sup> valores expressos em percentual

<sup>b</sup> valores expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

<sup>c</sup> valores expressos em pmol de DCF produzido/mg de proteína.

## V. DISCUSSÃO

A cafeína é uma droga neuroativa muito consumidas 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 várias drogas.

O tratamento crônico com cafeína e seus metabólitos (teofilina, hipoxantina, etc) há muito vêm sendo estudado por produzir tolerância, dependência física e síndrome de abstinência (HEISHMAN & HENNINGFIELD, 1992), além de seus possíveis efeitos citoprotetores (CHEN et al; 2001a), citotóxicos (GEPDIREMEN et al., 1998; KANG et al.; 2002) e anticancerígeno (HE 2003). Entretanto, pouco tem sido feito a respeito de cafeína e estresse oxidativo no sistema nervoso central, principalmente relacionado às enzimas antioxidantes.

O balanço entre defesas antioxidantes e a geração de radicais livres determina a extensão do dano causado pelas ERO (PAPADOPOULOS et al., 1998), o que pode levar ao rompimento de constituintes celulares (CASTAGNE et al., 1999). O sistema nervoso central é 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 (HARRIS, 1992; CASTAGNE et al., 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px), a peroxidação de lipídeos e a produção de radicais livres em homogenato de estruturas SNC (hipocampo cerebelo e estriado) de ratos tratados cronicamente com cafeína (1mg/ml - dose considerada moderada).

Nós trabalhamos com dois grupos: ratos controle que receberam água e ratos tratados com cafeína (1g/L) na água de beber por 7 dias consecutivos. Tem sido mostrado que este tempo de tratamento já é o suficiente para produzir tolerância aos efeitos estimulantes induzidos por uma dose aguda de cafeína na locomoção (SVENNINGSSON et al., 1999).

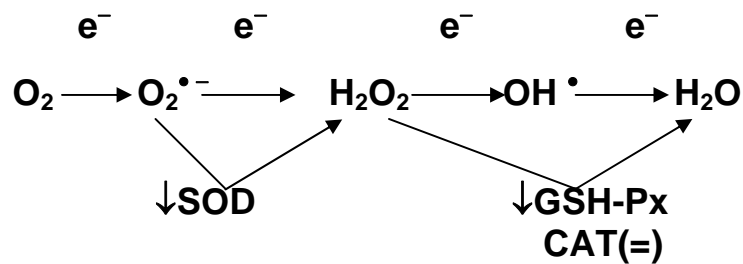
Os ratos foram sacrificados por decapitação no sétimo dia, a partir do início do tratamento, em torno das 16h sem a retirada prévia da droga. Nós consideramos que as concentrações de cafeína e/ou seus metabólitos (os quais mimetizam vários efeitos da cafeína) devem estar muito baixos no momento da decapitação dos animais, pois como os ratos 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). Foi observado que, em camundongos submetidos ao mesmo esquema de tratamento com cafeína (1g/L) que nós usamos, a concentração de cafeína plasmática era de 26  $\mu$ M (medida às 5 horas da manhã) (JOHANSSON et al 1997) e em ratos a concentração era de 5,95  $\mu$ g/ml de plasma (30  $\mu$ M) (GASIOR et al., 2000). Uma vez que em nosso trabalho os animais foram sacrificados em torno das 16h, neste período eles já estavam com 9h de abstinência da droga, ou seja, os níveis plasmáticos de cafeína estavam muito baixos.

Nossos resultados demonstraram que, nos animais que receberam cafeína, a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) mostraram-se significativamente diminuídas, quando comparados com os respectivos controles, porém não houve alteração na atividade da catalase (CAT) (Fig:4,5 e 6), nas três estruturas analisadas. Além disso, os animais tratados com cafeína apresentaram um aumento na peroxidação de lipídeos de membrana nas três estruturas analisadas quando comparados com os respectivos controles (Fig: 7). Esses resultados demonstram claramente um comprometimento das membranas lipídica celulares como resultado de um dano oxidativo induzido pelo tratamento com cafeína. Foi demonstrado que uma dose aguda de cafeína exacerba a peroxidação de lipídeos em membrana de córtex cerebral induzida por traumatismo craniano em ratos (MOUTAERY et al., 2003).

Uma vez que obtivemos aumento da peroxidação de lipídeos, esperávamos obter um aumento na produção de radicais livres, o que foi analisado através do

método do DCF. Porém, interessante seus níveis mantiveram-se inalterados (Fig: 8) nas estruturas cerebrais analisadas.

Essa discordância entre a peroxidação de lipídeos e a produção de radicais livre pode ser justificada porque, embora a técnica de DCF seja muito utilizada para mensurar o estresse oxidativo em células vivas, onde várias espécies causam oxidação do DCFH, incluindo  $RO^{\bullet}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $HOCl$  e  $ONOO^{-}$ , esta técnica não é muito sensível quando as ERO causadoras da lipoperoxidação são  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , ou seja, este é um ensaio para “estresse oxidativo generalizado” antes mesmo que haja produção de alguma espécie oxidada em particular e não sendo uma medida direta dos níveis de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Desse modo o DCF não deve ser usado conclusivamente para medir a formação de radicais superóxidos ou peróxido de hidrogênio em células que estejam sofrendo estresse oxidativo (ROTA et al., 1999). Portanto, apesar de não detectarmos diferenças na produção de radicais livres através do método do DCF, a cafeína de fato causou um dano oxidativo revelado pela peroxidação de lipídeos, o qual provavelmente foi devido em parte à diminuição da atividade da SOD (o que acumularia  $O_2^{\bullet-}$ ) e da atividade da GSH-Px (acumularia  $H_2O_2$ ). Por outro lado, a catalase não foi afetada pelo tratamento o que pode ser explicado pela propriedade desta enzima que, quando em baixas concentrações de  $H_2O_2$ , tem atividade de peroxidase agindo sobre pequenos substratos com a geração de radical alcoxil o que pode levar a uma cascata peroxidativa (Chance et al.; 1979). Desta forma, a catalase não conseguiu compensar a diminuição nas defesas antioxidantes levando a um estresse oxidativo, como se pode observar na figura 9.



**Figura 9:** Resumo esquemático do efeito da cafeína sobre as enzimas antioxidantes (SOD, GSH-Px e CAT), peroxidação de lipídeos (LPO) e produção de radicais livres (DCF).

Vários mecanismos poderiam ser propostos no sentido de explicar os efeitos da cafeína, uma vez que esta substância dependendo do tempo de administração e principalmente da dose poderia estar agindo em diferentes níveis celulares. Os complexos efeitos produzidos pela cafeína provavelmente não podem ser explicados por um único mecanismo (FREDHOLM et al., 1999). As ações moleculares da cafeína dependem da dose. Em doses baixas e moderadas semelhante ao consumo diário de café (a concentração plasmática de cafeína em humanos após uma xícara de café é de  $\pm 10 \mu\text{M}$ ), a cafeína age principalmente como um antagonista não seletivo de receptor  $A_1/A_2$  de adenosina (valores de  $K_i \pm 15 \mu\text{M}$ ) (FREDHOLM, 1995), já que xantinas têm pouca afinidade para os receptores  $A_3$  (JACOBSON, 1998). Em doses maiores, a cafeína inibe adicionalmente a atividade de fosfodiesterases e assim aumenta os níveis de AMPc. Em doses ainda maiores (10 mM), cafeína pode também elevar as concentrações intracelulares de cálcio por aumentar a captação de cálcio extracelular (HOECSH et al., 2001) e/ou estimular a liberação de cálcio do retículo endoplasmático (JANG et al., 2004) e, assim estimular a liberação de diferentes neurotransmissores (SHI et al., 1994; QUARTA et al., 2004).

Tendo em vista a dose de cafeína utilizada em nossos experimentos, discutiremos os resultados visando principalmente o papel da cafeína como antagonista não-específico dos receptores ( $A_1/A_2$ ) de adenosina.

A possível relação entre adenosina e estresse oxidativo tem sido evidenciada através de diferentes tipos de experimentos. Adenosina é liberada em situações de estresse oxidativo em diferentes tipos de célula (REGO et al., 1997; MASINO et al., 1999; CHEN et al., 2001b; ALMEIDA et al., 2003). 2-Cloro adenosina (agonista não específico da adenosina) diminui os níveis de malondialdeído produzidos durante o período de reperfusão - isquemia (YAVUZ et al 1997). Adenosina diminui os níveis de radicais livres produzidos por: injeção intracortical de íons ferro (YOKOI et al., 1995), deprivação de soro em células PC12 (HUANG, 2003) e pela ativação de proteína quinase C em células mesangiais (NOSAKA et al., 1996). Radicais livres promovem um aumento na expressão de receptores de adenosina do tipo A<sub>1</sub>(NIE et al., 1998).

Em relação às enzimas antioxidantes, 10 μM de R-PIA (agonista não específico de receptor de adenosina) aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e esta ativação foi abolida pela presença de teofilina (um metabólito da cafeína). Além disso, parece que a atividade basal destas enzimas é modulada tonicamente por adenosina, pois a retirada da adenosina endógena pelo tratamento das células com adenosina deaminase, diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes. Os autores concluíram que este efeito foi devido à ativação de receptor A<sub>3</sub> de adenosina, pois as células em estudo (células basofílicas leucêmicas - RBL-2H3) somente expressam receptor A<sub>3</sub>, mas interessante é que os efeitos foram inibidos por teofilina, e, no entanto xantinas têm pouca afinidade por receptores A<sub>3</sub> de adenosina. Os autores comentam que este efeito também foi observado em outros tipos de células (endotelial humana e bovina; cardiomiócitos de ratos; músculo liso; etc) que é sabido que expressam receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> para adenosina (MAGGIRWAR et al., 1994). Portanto, dependendo do tipo de tecido, pode ser que outros tipos de receptores para adenosina (A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>) estejam envolvidos no aumento da atividade de enzimas antioxidante.

O tratamento de ratos por 24 horas com um agonista específico para receptores A<sub>1</sub> de adenosina apresentou um aumento no conteúdo e atividade da Mn-SOD em células de músculo cardíaco. Este tratamento foi considerado cardioprotetor, pois reduziu o tamanho do infarto quando o coração isolado foi

submetido à isquemia/reperfusão (DANA et al., 2000). Uma outra evidência do envolvimento do receptor  $A_1$  é que ratos tratados por 3 dias com DPCPX, antagonista específico para receptores  $A_1$ , apresentaram um aumento de 90% nos níveis de malondialdeído em células renais (BHAT et al., 2002). Por outro lado, agonista de receptores  $A_2$  de adenosina promoveram uma diminuição nos níveis de radicais livres induzidos pela deprivação de soro em células PC12 (HUANG, 2003).

Portanto, parece claro que o mecanismo de ação da cafeína na inibição das enzimas antioxidantes foi devido ao bloqueio competitivo dos receptores de adenosina. No entanto, como cafeína é um inibidor inespecífico destes receptores, não podemos até o momento afirmar qual subtipo de receptor ( $A_1/A_2$ ) está envolvido nos efeitos da cafeína.

Sabe-se que a prolongada exposição de agonista de receptores acoplados à proteína G resulta em uma progressiva perda da funcionalidade deste receptor, enquanto a exposição ao antagonista causa um aumento na funcionalidade do receptor (BÖHM et al., 1997). Tendo dito isto, seria de se esperar que o tratamento crônico com antagonista de receptor de adenosina, como a cafeína, pudesse produzir alterações adaptativas nos receptores de adenosina, proteína G e adenilato ciclase no sentido de potencializar os efeitos da adenosina (LEITE-MORRIS et al., 1998).

Como comentado acima, se a adenosina, de alguma forma, aumenta as defesas antioxidantes da célula, esperávamos que o tratamento crônico com cafeína aumentasse a funcionalidade destes receptores e assim, aumentasse ainda mais as defesas antioxidantes da célula. Entretanto, o tratamento crônico com cafeína diminuiu a atividade destas enzimas. Portanto, a presença da cafeína, provavelmente, somente bloqueou os receptores de adenosina, impedindo a ação da adenosina endógena em manter os níveis basais das atividades das enzimas antioxidantes (MAGGIRWAR et al., 1994). Além disso, o tratamento crônico com cafeína aumenta a atividade das enzimas responsáveis por sua degradação, portanto estes efeitos podem também ter sido mediados



pelos metabólitos da cafeína, pois eles também se ligam aos receptores de adenosina. (SVENNINGSSON et al.; 1999).

Não há consenso entre os autores sobre o efeito causado pelo tratamento crônico com cafeína sobre o conteúdo e/ou expressão dos receptores  $A_1$  e  $A_2$  de adenosina. Alguns trabalhos demonstraram que tratamento crônico com cafeína produz aumento na expressão de receptores (DAVAL et al., 1989; HETTIGER-SMITH et al., 1996; LUPICA et al., 1991) ou um aumento no número total de receptores  $A_1$  de adenosina em tecido cerebral (RAMKUMAR et al., 1988; FREDHOLM, 1982; JOHANSSON et al., 1993). Outros estudos demonstraram que o tratamento crônico com cafeína não altera o número de receptores  $A_1$  nestes tecidos (HOLTZMAN et al., 1991; KAPLAN et al., 1993; ZIELKE & ZIELKE, 1987, JOHANSSON et al., 1997; SVENNINGSSON et al., 1999). Da mesma forma, alguns trabalhos têm demonstrado que o tratamento crônico com cafeína promove uma dessensibilização dos receptores  $A_1$  (LEÓN et al., 2002; LEÓN et al., 2005). O efeito do tratamento crônico com cafeína sobre receptores  $A_2$  de adenosina é menos estudado, mas as discrepâncias são as mesmas. O tratamento com cafeína diminui a expressão e os níveis de receptores  $A_2$  na parte rostral do estriado, mas não apresenta alterações em outras estruturas cerebrais (SVENNINGSSON et al., 1999), mas um aumento nos níveis destes receptores no estriado também foi observado (JOHANSSON et al., 1997). Assim, o efeito do tratamento crônico com cafeína sobre receptores de adenosina ainda é muito controverso.

Além disso, a cafeína apresenta um efeito estimulante sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical semelhante à resposta deste eixo a um estímulo estressante (POLLARD, 1988; NICHOLSON, 1987; CONCAS et al., 2000) e provavelmente a adenosina está envolvida neste mecanismo (DI SCIULLO et al., 1987; NICHOLSON, 1987). Foi demonstrado que ratos tratados por 3 dias com glicocorticóide apresentaram uma diminuição nas atividades da Cu/Zn SOD e GSH-Px no hipocampo, córtex cerebral e cerebelo; mas não alterou a atividade da catalase (MCINTOSH et al., 1998). Estes resultados são bem semelhantes aos encontrados no nosso trabalho. Portanto, pode ser que a

cafeína, ao bloquear os receptores de adenosina, promova um aumento nos níveis de glicocorticóides, o qual estaria promovendo uma diminuição das atividades das enzimas antioxidantes no SNC.

Embora alguns trabalhos demonstrem que a ingestão crônica de cafeína apresenta ação neurotoprotetora, provavelmente através dos receptores  $A_1$  e/ou  $A_2$  de adenosina, em nosso trabalho nós demonstramos que cafeína pode potencialmente provocar dano celular em estruturas do SNC através da diminuição das enzimas antioxidantes. Provavelmente, esse efeito seja devido a uma diminuição da expressão e/ou número de receptores de adenosina ( $A_1$  ou  $A_2$ ) ou a cafeína e/ou seus metabólitos estarem agindo somente como antagonistas competitivos, bloqueando a ação da adenosina endógena.

## VI. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- A ação da ingestão crônica da cafeína (1g/L) por uma semana causa dano oxidativo aos lipídeos de membrana de diferentes estruturas do SNC (hipocampo, cerebelo e estriado).
- Este efeito provavelmente foi devido à inibição da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px induzida pela ingestão de cafeína.

Além disso, tendo em vista a dose utilizada de cafeína, provavelmente, o efeito causado pela droga se deve ao bloqueio dos receptores de adenosina. Sendo assim, seria interessante avaliarmos seu efeito após diferentes tempos de abstinência da cafeína, bem como o uso de antagonistas mais específicos no sentido de determinarmos qual o subtipo de receptor ( $A_1$  ou  $A_2$ ) está envolvido na modulação da atividade das enzimas antioxidantes.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121 – 126, 1984

ABO-SALEM, O. M.; HAYALLAH, A. M.; BILKEI-GORZO, A.; FILIPEK, B.; ZIMMER, A.; MULLER, C. E. Antinociceptive Effects of Novel A<sub>2B</sub> Adenosine Receptor Antagonists. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308 (1): 258-366, 2004

AGOSTINHO, P.; CASEIRO, P. ; REGO, A. C. ; DUARTE, E. P. ; CUNHA, R. A. ; OLIVEIRA, C. R. Adenosine modulation of D-[<sup>3</sup>H]aspartate release in cultured retina cells exposed to oxidative stress. *Neurochemistry International* 36: 255 – 265, 2000.

ALMEIDA, C. G.; MENDONÇA, A.; CUNHA, R. A.; RIBEIRO, J. A. Adenosine promotes neuronal recovery from reactive oxygen species induce lesion in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters* 339 (2): 127 - 130, 2003.

AZAM, S.; HADI, N.; KHAN, N. U.; HADI, S. M. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xantine. *Medical Science Monitor*. 9: BR 325 – 330, 2003

BHAT, S .G.; MISHRA, S.; MEI, Y.; NIE, Z.; WHITWORTH, C. A.; RYBAK, L. P.; RAMKUMAR, V. Cisplatin up-regulates the adenosine A<sub>1</sub> receptor in the rat kidney. *European journal of Pharmacology* 442: 251 – 264, 2002.

BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of the radicals. *Life science* 65: 1865 – 1874, 1999.

BÖHM, S. K.; GRADY, E.F.; BUNNETT, N. W. Regulatory mechanisms that modulate signaling by G proteins-coupled receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 291: 76-80, 1997.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal Lipid Peroxidatio. *Methods in Enzymology* 52: 302 – 309, 1978.

CASTAGNE, V.; GAUTSCHI, M. ; LEFEVRE, K. ; POSADA, A.; CLARKE, P. G. H. Relationships Between Neuronal death and The Cellular Redox Status Focus on The Developing Nervous system. *Progress in Neurobiology* 59: 397 - 423, 1999.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiology Review* 59 (3): 527 – 625, 1979.

CHEN, J.F.; XU, K.; PETZER, J.P.; STAAL, Y. H.; BEILSTEIN, M.; SONSALLA, P.K.; CASTAGNOLI, N.; SCHWARZSCHILD, M.A. Neuroprotection by Caffeine and A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor Inactivation in a Model of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience* 21 RC143 1-6, 2001a.

CHEN, Y, F.; LI, P.L.; ZOU, A.P. Oxidative stress enhances the production and actions of adenosine in the kidney. *American Journal of Physiology: Regulatory , Integrative and Comparative Physiology* 281: R1808-1816, 2001b .

CONCAS, A.; PORCU, P.; SOGLIANO, C.; SERRA, M.; PURDY, R. H.; BIGGIO, G. Caffeine – Induced increases in the Brain and Plasma Concentrations of Neuroactive Steroids in the Rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 66, (1): 39 – 45,2000.

CUNHA, R. A. VIZI, E. S.; RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M. Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *Journal of Neurochemistry* 67: 2180 – 2187, 1996.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system; different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry International* 38 : 107 – 125, 2001.

DANA, A.; JONASSEN, A.K.; YAMASCHITA, N.; YELLON, D.M. Adenosine A<sub>1</sub> receptor induces delayed preconditioning in rats mediated by manganese superoxide dismutase. *Circulation* 101: 2841-2848, 2000.

DAVAL, J. L.; DECKERT, J.; WEISS, S. R.B.; WEISS, R. M.; POST, R. M.; MARANGOS, P. J. Upregulation of adenosine A<sub>1</sub> receptors and forskolin bindings sites following chronic treatment with caffeine or carbamazepine: a quantitative autoradiographic study. *Epilepsia* 30: 26 – 33, 1989.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; KAMAT, J. P. ; MOHAN, H. ; KESAVAN, P. C. Caffeine as an antioxidant; inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1282 : 63 – 70, 1996.

DI SCIULLO, A., SCACCIANOCE, S., ENDROCZI, E., NAVARRA, D., ANGELUCCI, L. Pituitary-adrenal response to adenosine. *Journal of Endocrinology* 112 Suppl., Abstract 269, 1987.

EVANS, W. J. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition* 72: 647s – 652s, 2000.

ERBA, D.; RISO, P.; FOTI, P.; FRIGEIRO, F.; CRISUOLI, F.; TESTOLIN, G. Black tea extract supplementation decreases oxidative damage in Jurkat T cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 416: 196 – 201, 2003.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assay of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology* 105: 114 – 121, 1984.

FREDHOLM, B. B. Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine. *Acta Physiologica Scandinavica* 115: 283 – 286, 1982.

FREDHOLM, B. B. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacology and Toxicology* 76: 93 – 101, 1995.

FREDHOLM, B. B.; BATTIG, K.; HOLMÉN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological reviews* 51 (1): 83 – 133, 1999.

GASIOR, M.; JASZYNA, M.; PETERS, J.; GOLDBERG, S. R. Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295 (3), 1101 – 1111, 2000.

GEPDIREMEN, A.; SÖNMEZ, S.; IKBAL, M.; DÜZENLI, S.; TUNA, S. Response to nimodipine in caffeine-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell culture of rat pups. *Pharmacological Research* 38 (4),: 239 – 242, 1998.

GREEN, R. M.; STILES, G. L. Chronic Caffeine Ingestion Sensitizes the A<sub>1</sub> Adenosine Receptor – Adenylate Cyclase System in Rat Cerebral Cortex. *Journal of Clinical Investigation* 77: 222 – 227, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in biology and medicine. Oxford University Press Inc. New York, 3<sup>rd</sup> edition, 1999.

HARRIS, E. D. Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB Journal* 6: 2675 – 2683, 1992.

He,Z.; MA, W.Y.; HASHIMOTO, T.; BODE, A.M.; YANG, C.S.;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, S. J.; HENNINGFIELD, J. E. Stimulus functions of caffeine in humans: relation to dependence potential. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 16: 273 – 287, 1992.

HETTINGER-SMITH, B. D.; LEID, M.; MURRAY, T. F. Chronic exposure to adenosine receptor agonist and antagonist reciprocally regulates the A<sub>1</sub> adenosine receptor – adenyl cyclase system in cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry* 67: 1921 – 1930, 1996.

HOESCH, R E., WEINREICH, D AND KAO. J.P.Y A Novel Ca<sup>2+</sup> Influx Pathway in Mammalian Primary Sensory Neurons Is Activated by Caffeine. *Journal of Neurophysiology* 86: 190–196, 2001.

HOLTZMAN, S. G.; MANTE, S.; MINNEMAN, K. P. Role of adenosina receptors in caffeine tolerance. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics.* 256: 62 – 68, 1991.

HUANG, N. K. Adenosine A<sub>2A</sub> receptors Regulate Oxidative stress formation in rat pheochromocytoma PC12 cells during serum deprivation. *Neuroscience Letters* 350: 127 – 131, 2003.



JANG, M.H.; MIN-CHUL SHIN, YOUNG-WUK CHO, HYUNG-HWAN BAIK, SUNG-SOO KIM EUN-GU HWANG, CHANG-JU KIM, 1,2-bis (2-aminophenoxy)ethane-N,N,N0N0-tetraacetic acid (BAPTA-AM) inhibits caffeine-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters* 358: 189–192, 2004.

JACOBSON, K. A.; VON LUBITZ, D. K. J. E.; DALY, J. W.; FREDHOLM, B. B. Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment. *Trends in Pharmacological Sciences* 17: 108-113, 1996.

JACOBSON, K. A. adenosine A<sub>3</sub> receptors: novel ligans and paradoxical effects. *Trends in Pharmacological Sciences* 19: 184-191, 1998.

JOHANSSON, B.; AHLBERG, S.; VAN DER PLOEG, I.; BRENE, S.; LINDEFORS, N.; PERSSON, H.; FREDHOLM, B. B. Effect of long term caffeine treatment on A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptors binding and om mRNA levels in rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 347: 407 – 414, 1993.

JOHANSSON, B.; GEORGIEV, V.; LINDSTRÖM, K.; FREDHOLM, B. B. A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptors and A<sub>1</sub> mRNA in mouse brain: effect of long-term caffeine treatment. *Brain Research* 762: 153 – 164, 1997.

KAISER, S. M.; QUINN, R. J. Adenosine receptors as potential therapeutic targets. *Drug Discovery Today* 4 (12): 542 – 551, 1999.

KANG, S. H.; LEE, Y. A.; WON, S. J.; RHEE, K. H.; GWAG, B. J. Caffeine-induced neuronal death in neonatal rat brain and cortical cell cultures. *Neurorepor* 13 (15): 1945 – 1950, 2002.

KAPLAN, G. B.; GRECENBLATT, D. J.; KENT, M. A.; COTREAU-BIBBO, M. M. Caffeine treatment and withdrawal in mice: relationships between dosage, concentrations, locomotor activity and A<sub>1</sub> adenosine receptor binding. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 266: 1563 – 1572, 1993.

LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica. Acta* 295: 141 – 154, 2000.

LEITE-MORRIS, K. A.; KAPLAN, G. B.; SMITH, J. G.; SEARS, M. T. Regulation of G protein and adenylyl cyclase in brain regions of caffeine – tolerant and – dependent mice. *Brain Research* 804: 52 – 62, 1998.

LEÓN, D.; ALBASANZ, J. L.; RUIZ, M. A.; FERNÁNDEZ, M.; MARTÍN, M. Adenosine A<sub>1</sub> receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *Journal of Neurochemistry* 82: 625 – 634, 2002.

LEÓN, D.; ALBASANZ, J.L.; RUIZ, M.A.; MARTÍN, M. Chronic caffeine or theophylline intake during pregnancy inhibits A<sub>1</sub> receptor function in the rat brain. *Neuroscience* 131: 481 – 489, 2005.

LOPES L.V., CUNHA R.A., RIBEIRO J.A., ZM 241385, an adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist, inhibits hippocampal A<sub>1</sub> receptor responses. *European Journal of Pharmacology* 383, 395-398, 1999

LUPICA, C. R.; BERMAN, R. F.; JARVIS, M. F. Chronic theophylline treatment increases adenosine A<sub>1</sub>, but not A<sub>2</sub> receptor binding in the rat brain: an autoradiographic study *Synapse* 9: 95 – 102, 1991.

MAGGIRWAR, S. B. ; DHANRAJ, D. N. ; SOMANI S. M.; RAMKUMAR, V. Adenosine Acts as an Endogenous Activator of The Cellular Antioxidant Defense System. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201 (2): 508 – 515, 1994

MASINO, S.A.; MESCHES, M. H.; BICKFORD, P.C.; DUNWIDDIE, T. V. Acute peroxide treatment of rats hippocampal slices induces adenosine-mediated inhibition of excitatory transmission in area CA1. *Neuroscience Letters* 274 91-94, 1999.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant anzymes in the molecular control of reactive species toxicology. *Toxicology* 153: 83 – 104, 2000.

MATÉS, J. M.; GÓMEZ, C. P.; CASTRO, I. N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry* 32 (8): 595 – 603, 1999.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant Enzymes and Their implication in pathophysiology. *Frontiers in Bioscience* 4: 339 – 345, 1999.

McINTOSH, L. J.; HONG, K. E.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Research* 791: 209-214, 1998.

MEI, Y.; GAWAI, K. R.; NIE, Z.; RAMKOMAR, V.; HELFERT, R. H. Age-related reductions in the activities of antioxidant enzymes in the rat inferior colliculus. *Hearing Research* 135: 169 – 180, 1999.

MENEGHINI, R. A toxicidade do Oxigênio. *Ciência Hoje* 5 Nº 28, 1987.

MONS, N.; COOPER, D. M. F. Adenylate Cyclases: critical foci in neuronal signaling. *Trends in Neuroscience* 18: 536 – 542, 1995.

MOUTAERY, K. A.; DEED, S. A.; KHAN, H. A.; TARIQ, M. Caffeine Impairs Short-Term Neurological Outcome After Concussive Head Injury in Rats. *Neurosurgery* 53: 704 – 712, 2003.

NICHOLSON, S. A. Stimulatory effect of caffeine on hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in the rat. *Journal of Endocrinology* 122: 535-543, 1987

NIE, Z. ; MEI, Y. ; FORD, M. ; RYBAK, L. ; MARCUZZI, A. ; REN, H.; STILES, G. L.; RAMKUMAR, V. Oxidative Stress increases A<sub>1</sub> Adenosine Receptor Expression by activating Nuclear Factor  $\kappa$ B. *Molecular Pharmacology* 53: 663 – 669, 1998.

NOSAKA ,K.; TAKAHASHI, T.; MIYANOSHITA, A.; NISHI, T.; SUZUKI, K.; KUROKAWA , K.; ENDOU, H. Effect of adenosine on phorbol myristate acetate induced-reactive oxygen metabolite production in cultured mesagial cell. *Free Radical Biology & Medicine* 20, 151-155, 1996.

O'REGAN M.H., SIMPSON R.E., PERKINS L.M., PHILLIS J.W. The selective A<sub>2</sub> agonist CGS 21680 enhances excitatory transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex. *Neuroscience Letters* 138, 169–172, 1992

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 55, 581-618, 1998.

PALMER, T. M.; STILES, G. L. Adenosine receptors. *Neuropharmacology* 34: 683 – 694, 1995.

PAPADOPOULOS, M. C.; KOUMENIS, I. L.; YUAN, T.Y.; GIFFARD, R. G Increasing vulnerability of Astrocytes to Oxidative Injury With Age Despite Constant Antioxidant Defenses. *Neuroscience* 82 (3): 915 – 925,1998.

PERES, W.; Radicais Livres em níveis Biológicos. 1° ed., Pelotas; EDUCAT, 1994.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable *Analytical Biochemistry* 83 (2): 346 – 456, 1977.

PINTOR, A.; GALLUZZO, M.; GRIECO, A.; PÈZZOLA, A.; REGGIO, R.; POPOLI, P. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist prevent the increase in striatal glutamate levels induced by glutamate uptake inhibitors. *Journal of Neurochemistry* 89: 152 – 156, 2004.

POLLARD, I. Increases in plasma concentrations of steroids in rat after the administration of caffeine: comparison with plasma disposition of caffeine. *Journal of Endocrinology* 119: 275-280. 1988.

QUARTA, D.; FERRÉ, S.; SOLINAS, M.; ZHI-BING YOU; HOCKEMEYER, J.; POPOLI, P.; GOLDBERG, S. R. Opposite modulatory roles for adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors on glutamate and dopamine release in the shell of the nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. *Journal of Neurochemistry*, 88: 1151 – 1158, 2004.

RAMKUMAR, V.; BUMGARNER, J. R.; JACOBSON, K. A.; STILES, G. L. Multiple Components of the A<sub>1</sub> Adenosine Receptor- Adenylate Cyclase System Are Regulated in Rat Cerebral Cortex by Chronic caffeine Ingestion. *The Journal Clinical. Investigation*. 82: 242 – 247, 1988.

RAMKUMAR, V. ; NIE, Z. ; RYBAK, L. P.; MAGGIRWAR, S. B. Adenosine, antioxidant enzymes and Cytoprotection. *Trends in Pharmacological Sciences* 16: 283 – 285, 1995.

RAMKUMAR, V.; HALLAM, D. M.; NIE, ZHONGZHEN Adenosine, Oxidative Stress and Cytoprotection. *Japan Journal of Pharmacology* 86: 265 – 274, 2001.

REGO, A. C.; SANTOS, M. S.; OLIVEIRA, C. R. Adenosine Triphosphate Degradation Products After Oxidative Stress and Metabolic Dysfunction in Cultured Retinal Cells. *Journal of Neurochemistry*. 69 (3): 1228 – 1235, 1997.

ROSSOWASKA, M. J.; 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.

ROTA, C; FANN, Y. C.; MASON, R. P. Phenoxy Free Radical Formation during the Oxidation of the Fluorescent Dye 2\*,7\*-Dichlorofluorescein by Horseradish Peroxidase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 274 (40): 28161–28168, 1999.

RUDOLPHI, K. A.; KEIL, M.; FASTBOM, J.; FREDHOLM, B. B. Ischemic damage in gerbil hippocampus is reduced following upregulation of adenosine (A<sub>1</sub>) receptors by caffeine treatment. *Neuroscience Letters* 103: 275 – 280, 1989.

SARANSAARI, P.; OJA, S. S. Enhance Release of adenosine under Cell-Damaging conditions in the Developing and Adult mouse Hippocampus. *Neurochemical Research* 28 (9): 1409 – 1417, 2003.

SAWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception (Review) *European Journal of Pharmacology* 317: 1 – 11, 1998.

SHI, D.; NIKODIJEVIC, O.; JACOBSON, K. A., DALY, J. W. Effects of Chronic Caffeine on Adenosine, Dopamine and Acetylcholine Systems in Mice. *Archives Internationales de Pharmacodynamies et de Therapie* 328 (3): 261 – 287, 1994.

SOLINAS, M. ; FERRÉ, S. ; YOU, Z. B.; KARCZ-KUBICHA, M. ; POPOLI, P.; GOLDBERG, S. R. Caffeine induces Dopamine and glutamate Release in the Shell of the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience* 22 (15): 6321 – 6324, 2002.

SVENNIGSSON, P.; FREDHOLM, B. B. Glucocorticoids Regulate the Expression of Adenosine A<sub>1</sub> but not A<sub>2A</sub> Receptors in Brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280: 1094 – 1101, 1997.

SVENNIGSSON, P.; NOMIKOS, G.G.; FREDHOLM, B.B. The Stimulatory Action and the Development of Tolerance to Caffeine Is Associated With Alterations in Gene Expression in Specific Brain Regions. *Journal of Neuroscience* 19 (10): 4011 – 4022, 1999.

TAKUMA, K.; BABA, A.; MATSUDA, T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Progress in neurobiology* 72: 111 – 127, 2004.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189: 41 – 54, 2003

VON LUBITZ, D.K.J.E.; LIN, R.C.S.; MELMAN, N.; XIAO-DUO, J.; CARTER, M.F.; JACOBSON, K.A. Chronic administration of selective adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist in cerebral ischemic. *European Journal of Pharmacology* 253: 95 – 99, 1994.

WANG, I. H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by a dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine* 27: 612 – 616, 1999.

WARDAS, J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Polish journal of Pharmacology* 54: 313 – 326.

YAMATO, T. ; YAMASAKI, S. ; MISUMI, Y. ; KINO, M.; OBATA, T.; AOMINE, M. Modulation of the stress response by coffee; na in vivo microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat. *Neuroscience Letters* 332 : 87 – 90, 2002.

YAVUZ, O.; TÜRKÖZKAN, N.; BILGIHAN, A.; DOGULU, F.; AYKOL, S. The effect of 2-chloroadenosine on lipid peroxide level during experimental cerebral ischemia-reperfusion in Gerbils. *Free Radicals Biology and Medicine* 22 (1/2): 337 – 347, 1997.

YOKOI, I.; TOMA, J.; LIU, J.; KABUTO, H.; MORI, A. Adenosine scavenged hydroxyl radicals and prevented posttraumatic epilepsy. *Free Radical Biology and Medicine* 19: 473-479, 1995.

ZIELKE, C. L.; ZIELKE, H. R. Chronic exposure to subcutaneously implanted methylxanthines. *Biochemical Pharmacology*. 36: 2533 – 2538, 1987.