



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO, CAFEÍNA E CAFÉ EM
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DE RATOS
DIABÉTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Naiara Stefanello

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO, CAFEÍNA E CAFÉ EM
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS
DIABÉTICOS**

Naiara Stefanello

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Prof Dr^a Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-orientadora: Prof Dr^a Luciane Belmonte Pereira

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO, CAFEINA E CAFÉ EM
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS
DIABÉTICOS**

elaborada por
Naiara Stefanello

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dr^a(Presidente/ Orientadora)

Vânia Lucia Loro, Dr^a (1º membro da banca)

Ricardo Brandão, Dr^o(2º membro da banca)

Santa Maria, 31 de agosto de 2012.

Dedico esta dissertação ao Marcelo, que esteve sempre me apoiando e sem ele esse trabalho não seria concluído.

A minha família, pelo apoio que me foi dado ao longo destes anos e por investirem nos meus sonhos.

Muito obrigada a todos que torceram por mim e estiveram comigo a cada vitória alcançada e me deram suporte nos momentos de dificuldade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família pelo infinito apoio. Minha Mãe Neli Stefanello e minha irmã Nádia Stefanello, e especialmente meu pai, Saulo Stefanello que precisou deixar o convívio familiar mais cedo, mas que nas horas definitivas exerceu a função de pai e amigo incentivando-me.

Muito obrigado ao Marcelo Guilherme de Lima que nos momentos mais duros e também nos felizes sempre esteve ao meu lado, sem ele este trabalho não teria fim.

Agradeço a professora e orientadora Maria Rosa Schetinger por me incentivar nesse trabalho e em outros trabalhos e principalmente por ter me aceitado como aprendiz.

A Roberta Schmatz e pela Luciane Belmonte por também por ter me mostrado os caminhos da pesquisa e me orientado infinitas vezes. Para a colega Daniela Zanini que soube compreender o momento de dificuldade o qual me encontrava e oferecer seu tempo.

A professora Vera Morsch que no momento em que mais precisei me estendeu a mão.

Agradeço à professora Cinthia Mazzanti por ter visto em mim uma pesquisadora há cinco anos quando lhe pedi se havia um laboratório em que eu pudesse fazer estágio. E por não ter perdido as esperanças em mim para levar-me ao caminho da felicidade.

Muito obrigada Rosélia Spanevello por ter me mostrado como é ser um pesquisador, obrigado por ter me proporcionado aprender com você em todos os sentidos de postura e amizade.

A todos os colegas de laboratório por ter compartilhado comigo o espaço, dúvidas, momentos tristes e angustiantes, momentos felizes, indignações, respeito e muitas outras experiências que são divididas em um ambiente de trabalho.

Aos professores Vânia e Ricardo por terem aceitado avaliar esse trabalho e por ser grandes professoras.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro a esse trabalho.

Agradeço ao meu mestre de vida Dr. Daisaku Ikeda, pois me incentivou sempre a correr atrás dos meus sonhos e ser feliz.

Muito obrigado a todos que de uma forma ou de outra participaram do meu aprimoramento como pesquisador e ser humano.

“Não há nada que seja maior evidência de insanidade do que fazer a mesma coisa dia após dia e esperar resultados diferentes.”

Albert Einstein

As memórias, porém, não são armazenadas de forma integral e, mesmo estabelecidas e consolidadas, não são permanentes. Este é o fenômeno do esquecimento: somos melhores na generalização e na abstração de conhecimentos do que na retenção de um registro literal de eventos. O esquecimento é fisiológico e ocorre continuamente, enfraquecendo o traço de memória do que foi aprendido. De fato, esquecer é uma função essencial ao bom funcionamento da memória: seria impossível, e pouco prático, evocar com riqueza de detalhes todas as informações que necessitamos num único dia.
(Carla Dalmaz e Carlos Alexandre Netto).

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO, CAFEÍNA E CAFÉ EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS DIABÉTICOS

Autora: Naiara Stefanello

Orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-orientadora: Luciane Belmonte Pereira

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de agosto de 2012.

Estudos demonstraram que a hiperglicemia no diabetes leva a complicações cognitivas, fisiológicas e estruturais no sistema nervoso central (SNC), causadas principalmente pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), que contribuem para o desenvolvimento de complicações crônicas do estado diabético. O ácido clorogênico é um composto fenólico encontrado no café que apresenta atividade antioxidante, neuroprotetora e hipoglicemiante. Além disso, a cafeína também é encontrada em altas concentrações no café e se destaca por sua ação antioxidante, neuroprotetora e psico-estimulante. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do ácido clorogênico (CGA), cafeína (CA) e café (CF) na atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), Na^+ , K^+ -ATPase e δ - aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), assim como seus efeitos no níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no córtex cerebral, bem como na memória e ansiedade no diabetes induzidos por estreptozotocina (STZ) 60 mg/kg em ratos. Os animais foram divididos em oito grupos: Controle; controle/CGA 5 mg/kg; Controle/CA 15 mg/kg; Controle/CF 0,5 g/kg; Diabéticos; diabético/CGA 5 mg/kg; diabético/CA 15 mg/kg e diabético/CF 0,5 g/kg. Após 29 dias de tratamento com os compostos, os animais foram submetidos a testes comportamentais (esquiva inibitória e labirinto em cruz elevada) e, em seguida, submetidos a eutanásia e o córtex cerebral retirado. Os nossos resultados demonstraram que a atividade da AChE e os níveis de TBARS foram aumentados em córtex cerebral, enquanto que a atividade da δ -ALA-D e Na^+ , K^+ -ATPase foram diminuídas em ratos diabéticos quando comparado com os ratos controles. Além disso, os ratos diabéticos mostraram déficit na memória e um aumento na ansiedade. Houve uma prevenção no aumento da atividade da AChE quando os ratos diabéticos foram tratados com CGA e CA quando comparados com os ratos não tratados. A ingestão de CGA, CA e café restauraram parcialmente a atividade da δ -ALA-D e Na^+ , K^+ -ATPase em ratos diabéticos quando comparado com o grupo diabético sem tratamento. Além disso, os níveis de TBARS foram encontrados diminuídos nos ratos diabéticos tratados com CGA. O tratamento com CGA em ratos diabéticos também demonstrou uma melhora na memória e uma diminuição na ansiedade. Os resultados mostraram que esses compostos principalmente o CGA, composto que apresentou melhores efeitos, podem modular estas enzimas no SNC, que são alterados no diabetes.

Palavras-chave: Cafeína, ácido clorogênico, café, Diabetes Mellitus e memória.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF CHLOROGENIC ACID, CAFFEINE AND COFFEE IN BEHAVIOR AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF DIABETIC RATS

Author: Naiara Stefanello

Advisor: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-advisor: Luciane Belmonte Pereira

Place and Date: Santa Maria, August 31, 2012.

Studies have shown that the hyperglycemia in diabetes leads to complications in cognitive, physiological and structural central nervous system (CNS) mainly linked with increased production of reactive oxygen species (ROS), which contribute to the development of chronic complications of the diabetic state. Chlorogenic acid is a phenolic compound found in coffee that presents antioxidant, neuroprotective and hypoglycemic function. In addition, caffeine is also found in high concentrations in coffee and is known for its antioxidant, neuroprotective effects and psycho-stimulant. The objective of this study was to evaluate the effect of chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) in acetylcholinesterase (AChE), Na⁺,K⁺-ATPase and Aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activities, as well as lipid peroxidation levels (TBARS) from cerebral cortex, memory and anxiety on streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. The animals were divided into eight groups (n=6–13): Control; Control/CGA 5 mg/kg; Control/CA 15 mg/kg; Control/CF 0.5 g/kg; Diabetic; Diabetic/CGA 5 mg/kg; Diabetic/CA 15 mg/kg e Diabetic/CF 0.5 g/kg. Two-nine days after treatment with compounds, the animals were submitted to behavioral tests (Inhibitory avoidance and elevated plus maze) and then sacrificed and the cerebral cortex was collected. Our results demonstrated that AChE activity and TBARS levels were increased in cerebral cortex, while δ -ALA-D and Na⁺, K⁺-ATPase activities were decreased in the diabetic rats when compared to the control group. Furthermore, the diabetic rats showed deficit in memory and an increase in the anxiety. There was prevention in the increase of AChE activity when diabetic rats were treated with CGA and CA when compared with untreated rats. CGA, CA and Coffee intake restored partially cerebral δ -ALA-D and Na⁺, K⁺-ATPase when compared to untreated diabetic group. Moreover, CGA prevented diabetes-induced TBARS production and improve the memory and decrease the anxiety. Our results showed that CGA, CA and coffee can modulate cerebral oxidative stress and δ -ALA-D and Na⁺, K⁺-ATPase activity in a model of diabetes type I. Consequently, we can suppose that these compounds mainly the CGA, which has the better effect, could modulate this enzymes in CNS that are altered in diabetes.

Keywords: caffeine, chlorogenic acid, coffee, Diabetes Mellitus, memory.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores recomendados pela associação americana de diabetes (ADA) para o diagnóstico de DM.....	17
-----------	--	----

Manuscrito

Tabela 1-	Peso corporal de ratos diabéticos induzidos por STZ e tratados com ácido clorogênico, cafeína e café.....	65
Tabela 2	Efeitos do tratamento com ácido clorogênico (ACG), cafeína (CA) e café (CF) em ratos diabéticos induzidos por STZ no aumento dos níveis de glicose. (n=10).....	66

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1	Estrutura química da molécula da A) glicose e B) estreptozotocina...	19
Figura 2	Relação entre a via dos polióis, hexosamina, proteína quinase C, formação de AGE e o estresse oxidativo nas complicações induzidas pela hiperglicemia.....	20
Figura 3 -	Esquema da topografia de membrana da enzima Na ⁺ , K ⁺ -ATPase,...	22
Figura 4 -	Esquema de uma sinapse colinérgica: Acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase sináptica (AChE-S), receptor muscarínico do tipo 1 (M1), receptor muscarínico do tipo 2 (M2), transportador de ACh vesicular (TACHV).....	25
Figura 5 -	Principais estruturas químicas dos ácidos fenólicos.....	31
Figura 6 -	Via metabólica proposta para o ácido clorogênico.....	33
Figura 7 -	Via do metabolismo da cafeína: no qual (CYP1A2) citocromo P450 1A2; (CYP2A6) citocromo P450 2A6; (NAT2) N-acetiltransferase 2; (XO), xantina oxidase.....	36

Manuscrito

Figura 1 –	TBARS levels in cerebral cortex from STZ-induced diabetic rats and those treated with water, chlorogenic acid, caffeine and coffee. Bars represent means±SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, at P< 0.05, n=5. # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group, at P< 0.05, n=5.....	
Figura 2	δ-ALA-D activity in cerebral cortex from STZ-induced diabetic rats and those treated with water, chlorogenic acid, caffeine and coffee. Bars represent means±SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group, at P< 0.05, n=5.....	69

Figure 3	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase activity in cerebral cortex from STZ-induced diabetic rats and those treated with water, chlorogenic acid, caffeine and coffee. Bars represent means±SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group, at P< 0.05, n=8-10.....	71
Figure 4	AChE activity in synaptosomes of cortex cerebral from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means±SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test.* indicates a significant difference in relation to the control group, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group, at P< 0.05, n=8-10.....	72
Figura 5	Effects of chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) on memory test in the inhibitory avoidance from STZ-induced diabetic rats. Time of descent of the platform is demonstrated by median ± interquartile. * indicates a significant difference in relation to the other groups, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group and • indicates values similar to diabetic and control group (P<0.05) n= 8-11.....	73
Figura 6	Effects of chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) on anxiolytic-like behavior test in the elevated plus-maze from STZ-induced diabetic rats. Which Graph 6A represent the % number of closed arm entries, at P<0,05. In the graph 6B represent the % time in the closed arms, at P<0,01. In the graph 6C represent the time in center. Graph 6D shows % time in open arm. Graph 6D represent the total number of entries Data are reported as means ± SEM. Two-way ANOVA was used * indicate a significant difference in relation to the control group, # indicate a significant difference in relation to the diabetic control group, at P< 0.05, n=8-10.....	74

LISTA DE ABREVIACOES

DM – Diabetes Mellitus
OMS – Organizao Mundial da Saúde
ADA – Associação Americana de Diabetes
TOTG – Teste Oral de tolerância a Glicose
Hb - Hemoglobina
STZ - Estreptozotocina
DNA – cido desoxirribonucléico
NO – Oxido Ntrico
AGEs – Produtos de glicação avançadas
NAD – Nicotinamida adenina dinucleotdio
PKC – Proteína quinase C
ATP - Adenosina Trifosfato
Na⁺ - Sódio
K⁺ - Potássio
 δ -ALA-D - Delta aminolevulinato desidratase
ALA - cido delta-aminolevulínico
GABA – cido gama aminobutírico
ACh – Acetilcolina
ChAT - colina acetiltransferase
CHT- Transportador de colina
TACHV - Transportador de acetilcolina vesicular
AChRm - Receptores de acetilcolina muscarínicos
AChRn - Receptores de acetilcolina nicotínicos
AChE - Acetilcolinesterase
ACG – cido clorogênico
DCV – Doença cardiovascular
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
CA – Cafeína
A₁R – Receptor de adenosina 1A
A_{2A}R - Receptor de adenosina 2A

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

SNC – Sistema nervoso central

CYP 1A2 – Citocromos P450 isoforma 1A2

CYP 2A6 – Citocromos P450 isoforma 1A2

NAT 2 – N-acetiltransferase 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo Geral.....	38
2.2 Objetivos Específicos.....	38
3.MANUSCRITO.....	40
4. CONCLUSÕES.....	75
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representa a íntegra deste estudo.

O item Conclusões encontra-se no final desta dissertação e apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As referências referem-se somente às citações que aparecem no item Introdução desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para o qual foi submetido: *Neurochemical Research*.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um grande problema de saúde pública no qual dados da organização mundial da saúde (OMS) demonstram que essa patologia é a 9ª maior causa de morte no mundo (OMS, 2012). Além disso, devido à modernização e conseqüente mudança no estilo de vida com a inclusão de dietas ricas em gorduras e açúcares e aumento do sedentarismo tem levado a uma maior incidência do DM. Isto leva ao desenvolvimento de uma série de outras doenças como, por exemplo, a síndrome metabólica e doença cardiovascular (WHO, 2012; LIEBERMAN, 2003). Além disso, o número de pessoas com diabetes somente nas Américas foi estimado em 62,8 milhões em 2011, e espera-se alcançar 91,1 milhões em 2030 (OMS, 2012).

O Diabetes agrupa um conjunto de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante de defeitos na secreção da insulina, ou defeitos na ação desse hormônio, ou ainda em ambas as condições. Alguns processos podem estar envolvidos no desenvolvimento da DM. Estes variam desde a destruição autoimune das células β do pâncreas com conseqüente deficiência da síntese de insulina até a resistência dos tecidos corporais à insulina. Ambos os processos levam ao metabolismo anormal de carboidratos, proteínas e lipídios, pois um déficit na ação da insulina leva a uma diminuição da resposta dos tecidos à ação desse hormônio, o qual é responsável pelo controle de muitas vias complexas em muitos tecidos do corpo, levando a um conseqüente aumento da glicose sanguínea (ADA, 2012).

O DM pode ser classificado em diferentes tipos. Entre eles podemos citar: Diabetes Mellitus tipo I (DM tipo I), Diabetes Mellitus tipo II (DM tipo II) e diabetes gestacional. O DM tipo I é caracterizado por uma destruição das células β , o qual o paciente depende de insulina exogenamente. Manifesta-se principalmente quando o paciente ainda é jovem e abrange cerca de 10% dos pacientes com DM. Essa destruição das células β pode estar relacionada tanto com fatores genéticos quanto com fatores ambientais, os quais ainda não estão totalmente esclarecidos (GANNON, 2001; ADA, 2012).

O DM tipo II acomete cerca de 90% dos pacientes diabéticos. Está relacionada principalmente a pacientes adultos onde estes possuem resistência a insulina, pois normalmente liberam esse hormônio na corrente sanguínea, contudo ele não consegue exercer corretamente sua função (GANNON, 2001). Embora a etiologia específica ainda não seja totalmente conhecida, esse tipo de DM está associado principalmente ao estilo de vida, onde

resistência à insulina pode estar relacionada com a obesidade e também ao estresse (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000).

O DM gestacional é caracterizado por uma alteração nos níveis glicêmicos sanguíneos que é frequentemente encontrado durante a gravidez. Pode-se ainda destacar outras causas que podem levar o indivíduo a desenvolver um quadro de DM: defeitos genéticos nas células β ; defeitos genéticos na ação da insulina; doenças pancreáticas como pancreatite, trauma pancreático, pancreatectomia, carcinoma pancreático; endocrinopatias; indução química de DM por drogas; infecções tais como rubéola e citomegalovirose e algumas síndromes genéticas como a síndrome de Down (ADA, 2012).

O diagnóstico do DM pode ser obtido pelos seguintes testes: glicose de jejum ou na concentração de glicose sanguínea após o teste oral de tolerância a glicose (75g - TOTG). Podemos observar pela tabela 1:

Glicemia de jejum	Valores para glicemia	TOTG	Valores para tolerância a glicose
Normal	<100 mg/dL= (5,6 mmol/L)	Normal	<140 mg/dL (7,8 mmol/L)
Alterada	entre 100-125 mg/dL (5,6-6,9 mmol/L)	Tolerância Diminuída	140-199 mg/dL (7,8-11,1 mmol/L)
Diabético	\geq 126 mg/dL = (7,0 mmol/L)		

Tabela 1: Valores recomendados pela associação americana de diabetes para o diagnóstico de DM.

Além do teste de glicemia de jejum, o diagnóstico deve ser confirmado através do TOTG, o qual é medido duas horas após a ingestão de 75 g de glicose (ADA, 2007). Podemos citar também o crescente envolvimento da hemoglobina glicosilada (Hb A1C) no acompanhamento do diagnóstico do DM. Pacientes com níveis de HbA1C acima do intervalo "normal" de laboratório, mas abaixo do ponto de corte para diagnóstico de diabetes (6,0 a <6,5%) apresentam um risco muito elevado de desenvolver diabetes. De fato, a incidência de diabetes em pessoas com níveis de HbA1c nesta faixa é 10 vezes maior do que pessoas com níveis mais baixos (EDELMAN et al., 2004; ADA, 2012).

A hiperglicemia causa efeitos no sistema vascular que podem resultar em alterações em todos os órgãos. Podemos destacar as complicações macro e microvasculares que são as principais causas de morbidade e mortalidade no DM tipo I e tipo II. As complicações macrovasculares incluem doença arterial coronariana, doença arterial periférica e o acidente vascular cerebral. Enquanto que as complicações microvasculares são divididas entre nefropatia diabética, neuropatia e retinopatia. As alterações macrovasculares estão relacionadas principalmente com a aterosclerose e com a síndrome metabólica levando principalmente ao aumento da agregação plaquetária, que pode contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento de doença cardiovascular e conseqüentemente levar a morte. As alterações microvasculares dependem da severidade e da duração da hiperglicemia podendo levar anos até que ocorra lesão significativa nos rim ou na retina por exemplo (JAKUS, 2000; FOWLER, 2008).

Essas alterações também podem ser mimetizadas em estudos animais com modelos químicos de indução de Diabetes. Entre os mais comuns estão DM induzida por estreptozotocina (STZ) e por aloxano, as quais apresentam efeito seletivo às células β pancreáticas. A STZ tem estrutura semelhante à glicose (figura 1), dessa forma, é transportada para o interior da célula β através do transportador de glicose GLUT-2, que é altamente expresso pelas células produtoras de insulina nas ilhotas de Langerhans (SCHNEDL et al., 1994). O mecanismo envolvido na indução de diabetes está relacionado a produção de espécies reativas capazes de promover a alquilação de bases de ácido desoxirribonucleico (DNA) em vários níveis, causando alterações letais ao metabolismo de células β por deprimirem os níveis de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD). Além disso, o óxido nítrico (NO) que pode ter origem da decomposição espontânea da STZ pode estar envolvido na morte celular devido a sua interação com os radicais livres (ASPLUND et al., 1984; TAKAMA, et al., 1995). Em adição, recentes estudos têm utilizado a associação entre STZ e nicotinamida, o qual pode diminuir os efeitos citotóxicos da STZ e ainda pode induzir anormalidades claras na tolerância à glicose e capacidade de resposta à insulina, podendo caracterizar um quadro de DM tipo II (MASIELLO et al., 1998). Ambos os modelos levam ao quadro hiperglicêmico característico no DM.

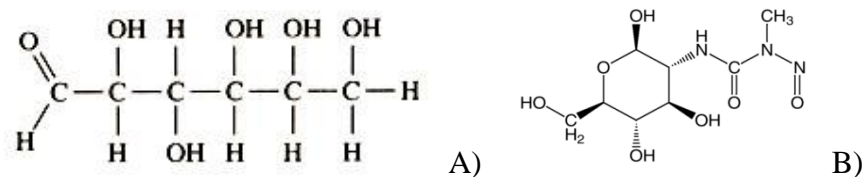


Figura 1: Estrutura química da molécula da A) glicose e B) estreptozotocina.

Os mecanismos que estão relacionados às alterações causadas pela hiperglicemia podem ser devido a:

A) Auto-oxidação da glicose na presença de íons, a qual pode contribuir para um aumento na produção de radicais livres.

B) Formação de produtos de glicação avançada (AGEs) que são resultado da ligação entre a glicose e os aminoácidos das proteínas (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000), as quais apresentam função alterada. Além disso, os componentes da matriz extracelular interagem com seus componentes de forma anormal. Também podem causar alteração na expressão genética de algumas proteínas (BROWNLEE, 2001).

C) O excesso de glicose pode ainda ser metabolizado na via dos polióis, na qual a glicose é reduzida pela aldose redutase em sorbitol. Nesse processo, ocorre uma depleção nos níveis de NADPH (co-fator dessa reação), o qual é importante para a algumas enzimas antioxidantes, as quais se encontram reduzidas nesse processo (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000).

D) Pode ocorrer uma ativação da proteína quinase C (PKC), o qual pode estar relacionado com o aumento do segundo mensageiro diacilglicerol (DAG) devido à hiperglicemia. Em consequência da ativação da PKC, muitas mudanças celulares podem ser descritas, como anormalidades no fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular, oclusão vascular, aumento da expressão de genes pró-inflamatórios e aumento de espécies reativas.

E) Um aumento na via da hexosamina, onde a frutose-6-fosfatase (intermediária da via glicolítica) é convertida em glicosamina-6-fosfato por uma enzima específica da via. Posteriormente, ocorre a formação de intermediários que aumentam a transcrição do fator de crescimento tumoral. Além disso, essa via é importante para a resistência à insulina induzida por ácidos graxos (BROWNLEE, 2001).

F) Os processos citados acima refletem o aumento do estresse oxidativo principalmente devido a superprodução do ânion superóxido pela cadeia de transporte de elétrons

mitocondrial (DU et al., 2000) que também tem uma grande relação com as complicações do DM.

Estudos sugerem que todas essas vias atuam de forma conjunta nas células. Brownlee (2001) discute que o aumento do ânion superóxido inibe a enzima gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase (GAPDH), o qual leva a um acúmulo nos intermediários da via glicolítica levando a uma aumento na via dos polióis, na via da hexosamina, um aumento na PKC e também na formação de AGEs (Figura 2).

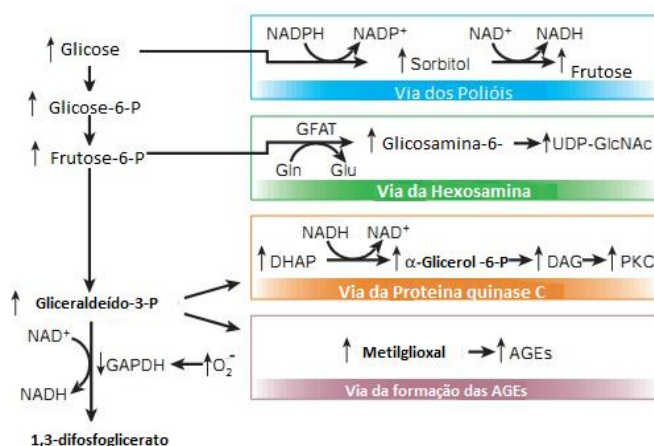


Figura 1: Relação entre a via dos polióis, hexosamina, proteína quinase C, formação de AGE e o estresse oxidativo nas complicações induzidas pela hiperglicemia. Adaptação de Browlee, 2001.

O DM também pode levar a danos no sistema nervoso central (SNC). O córtex cerebral é uma estrutura complexa e corresponde à camada mais externa do encéfalo sendo rica em neurônios e o local do processamento neuronal mais sofisticado e distinto. Esta estrutura desempenha um papel central em muitas funções complexas associadas à linguagem, a percepção, a emoção, a cognição e a memória (BRODMANN, 1908; BYSTRON et al., 2008). Tendo em vista a importância dessa estrutura no funcionamento do cérebro, o DM pode levar a alterações cognitivas e comportamentais (RAJASHREE et al., 2011), ansiedade (HUSAIN et al., 2011), bem como a alteração do metabolismo de neurotransmissores (BELLUSH et al., 1991), a qual pode ser denominada de encefalopatia diabética. A hiperglicemia no SNC pode causar um aumento do estresse oxidativo, bem como um aumento das outras vias descritas

anteriormente. Além disso, pode provocar um aumento na peroxidação lipídica e um desbalanço na geração de espécies reativas e no sistema de defesa antioxidante (SIMA et al., 2004).

São componentes do sistema antioxidante as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e os componentes não enzimáticos como a glutatona reduzida (GSH), Vitamina C e Vitamina E. Sabe-se que o sistema de defesa antioxidante no SNC é reduzido quando comparado com outros órgãos como o fígado. Dessa forma, o SNC é mais suscetível ao estresse oxidativo, resultando em danos no tecido cerebral. Estudos têm demonstrado que há um aumento nos níveis de lipídios oxidados no cérebro em modelos de diabetes (KUMAR & MENON, 1993; PARI & MURUGAN, 2007; KADE, 2009). Em adição, é conhecido que o cérebro consome altas concentrações de oxigênio e apresenta altas concentrações de lipídios, que são importantes para a função cerebral. Um exemplo é a constituição da bainha de mielina. Assim, alterações nos lipídios cerebrais podem levar a alterações na transmissão do impulso nervoso, bem como nas enzimas que controlam esse processo (KUMAR & MENON, 1993, PARI & MURUGAN, 2007; KADE et al., 2009).

Uma enzima importante no controle das funções cerebrais é a Na^+ , K^+ -ATPase (E.C. 3.6.1.37). A função dessa enzima está relacionada principalmente ao transporte ativo de sódio e potássio (SKOU, 1957). A enzima utiliza uma molécula de ATP para promover o efluxo de três íons Na^+ e o influxo de dois íons K^+ contra seus gradientes eletroquímicos (Figura 3), consumindo cerca de 40-60% do ATP sintetizado no cérebro (SAVAKI et al., 1980; ERECINSKA & SILVER, 1989). O transporte mediado pela Na^+ , K^+ -ATPase é vital para as funções celulares, as quais podemos citar regulação do volume celular, manutenção do potencial transmembrana e excitabilidade, transporte transepitelial de sal e água entre outros (THOMAS, 1972; CORNELIUS, 1991).

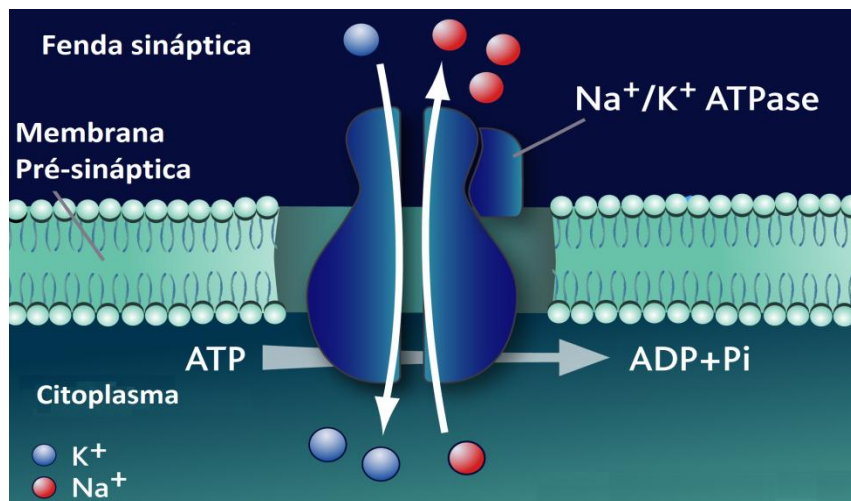


Figura 3: Esquema da topografia de membrana da enzima Na⁺, K⁺-ATPase, Na⁺. Adaptação do site: http://www.cnsforum.com/imagebank/item/rcpt_sys_Nak_reup/default.aspx

A regulação da Na⁺,K⁺-ATPase pode ser realizada de diferentes formas:

- 1) Na⁺,K⁺-ATPase pode ser regulada pelos substratos: ATP, Na⁺ e K⁺ (BREZIS & ROSEN, 1995).
- 2) Os esteróides endógenos tais como o cardiotônicos ouabaína que inibe especificamente a bomba de sódio e potássio (THERIEN et al., 1997).
- 3) Sendo uma enzima transmembrana, os lipídios constituintes da membrana celular tem função de apoiar a enzima à célula e dessa forma podem controlar a atividade dessa enzima (VAGUE et al., 2004).
- 4) Ainda a Na⁺, K⁺-ATPase pode ser regulada por hormônios, as catecolaminas têm vários efeitos sobre a atividade da bomba, a dopamina tem um efeito inibitório enquanto que a epinefrina e norepinefrina um efeito estimulante (THERIEN et al., 1997). A insulina estimula a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, além de aumentar a translocação de bombas de sódio a partir de reservas intracelulares para a superfície celular, o teor de sódio citoplasmático, e também a afinidade aparente da enzima pelo sódio (SWEENEY & KLIP, 1998).

Entre as alterações induzidas pela DM, distúrbios na atividade Na⁺, K⁺-ATPase têm sido amplamente relatados (VER et al., 1995; SANTINI et al., 1996; SIMA & SUGIMOTO, 1999). Entre os mecanismos relacionados com a alteração da atividade dessa enzima pode-se citar o aumento do estresse oxidativo e a formação de produtos de glicação avançados (SIMA & SUGIMOTO, 1999). Além disso, o comprometimento na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase

poderia estar relacionada com a hiperglicemia através de um aumento da glicosilação da subunidade β envolvida na maturação da enzima e sua localização e de estabilização na membrana plasmática (EAKLE et al., 1994 apud VAGUE et al., 2004).

Outra enzima presente no SNC é a enzima citoplasmática delta aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D, E.C.4.2.1.24) podendo também ser chamada de porfobilinogênio sintetase ou também 5-aminolevulinato hidrolase. Essa enzima é uma metaloenzima que catalisa a formação do porfobilinogênio através da condensação e ciclização de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (ALA) (GIBSON et al., 1955). Essa reação é importante na síntese de compostos tetrapirrólicos tais como as bilinas, clorofilas e heme. Os quais fazem parte de proteínas importantes tais como os citocromos no transporte de elétrons, enzimas antioxidantes e na biotransformação de drogas (TIMBRELL, 1991). Para sua atividade catalítica essa enzima depende de íons metálicos. Nas isoformas presentes em animais esse metal é o zinco (GIBSON et al., 1955). Além disso, o zinco está fixo há enzima por grupos tiólicos de alguns aminoácidos cisteínas. Dessa forma, estudos têm demonstrado que essa enzima pode ter sua atividade alterada por agentes que interagem com os grupos tiólicos presentes no sítio ativo da δ -ALA-D (DENT et al., 1990; FOLMER et al., 2003).

Além do zinco presente no sítio ativo da enzima, podemos citar outros componentes que também são necessários para a atividade da δ -ALA-D. Primeiramente, um resíduo do aminoácido lisina, a qual se liga a primeira molécula de substrato através de uma base de Schiff. Segundo, um resíduo de histidina que participaria do mecanismo de transferência de prótons no sítio ativo da enzima. Terceiro, os resíduos de cisteína apontados anteriormente, que devem estar reduzidos para que a enzima conserve a ligação com o zinco e mantenha sua atividade (TSUKANOTO et al., 1979; GIBBS & JORDAN, 1986).

É importante notar que estudos têm demonstrando que a atividade da δ -ALA-D se encontra inibida em modelos experimentais de DM (BARBOSA et al., 1998; FOLMER et al., 2003; SCHMATZ et al., 2012), bem como em pacientes diabéticos (CABALLERO et al., 1995). Como descrito anteriormente, a glicose pode promover a glicação de algumas proteínas, esse efeito poderia ser o responsável pela inibição da enzima δ -ALA-D. Além disso, o aumento de radicais livres, bem como a auto-oxidação da glicose também pode contribuir para esse efeito (FOLMER et al., 2002). Em adição, a glicosilação do aminoácido lisina presente no sítio ativo da enzima δ -ALA-D, também tem sido descrita por interferir na sua atividade normal (JAFFE & MARCKHAM, 1987).

Como efeito direto da inibição da δ -ALA-D pode-se citar o acúmulo do ALA, o qual também pode ter efeitos diretos nos diferentes tecidos. Esse acúmulo pode levar a um

aumento na produção de espécies reativas e aumentar o estresse oxidativo (BECHARA, 1996). Além disso, no SNC também ocorrem alterações importantes. É descrito que o acúmulo de ALA pode levar a alterações significativas nas ações de alguns neurotransmissores no cérebro. O ALA é um análogo estrutural do neurotransmissor ácido gama aminobutírico (GABA), do glutamato e do aspartato. Assim pode inibir a captação desses neurotransmissores no cérebro. Além disso, o ALA compete com o GABA para ligar-se a seus receptores e pode levar também a uma redução da libertação de GABA nas sinapses centrais (MULLER & SNYDER, 1977; BRENNAN & CANTRILL, 1981; McLOUGHLIN & CANRILL, 1984). Em adição, o acúmulo de ALA também pode levar a uma inibição da Na^+ , K^+ -ATPase (BECKER et al., 1971; RUSSEL et al., 1983). Esses efeitos podem contribuir para alterações no funcionamento do SNC.

O sistema colinérgico é fundamental para a regulação do cérebro (SOREQ, 2001), pois está associado com algumas funções como o aprendizado e a memória (NABESHIMA, 1993). Também, está interligado com a junção-neuromuscular, regulando os movimentos (ADULNATE, 2004). O sistema colinérgico é composto por: acetilcolina (ACh), colina acetiltransferase (ChAT), transportador de colina (CHT), transportador vesicular de colina (VChT), os receptores nicotínicos (nAChRs) e muscarínicos (mAChRs) de ACh e da enzima acetilcolinesterase (AChE E.C.3.1.1.7) (KAWASHIMA, 2003; ABREU-VILLAC, 2011).

A ACh é um neurotransmissor excitatório sintetizado a partir de uma molécula de colina e acetil-coenzima A pela ação da enzima colina acetiltransferase (DAS, 2007). A seguir a ACh é armazenada em vesículas pré-sinápticas, onde o VChT será responsável pela liberação desse neurotransmissor na fenda sináptica. Quando liberada na fenda, a ACh pode se ligar aos dois tipos de receptores, que são os nAChR e os mAChRs. Posteriormente a ACh é hidrolisada pela enzima AChE em colina e acetato e grande parte desse produto é recaptado pelo CHT localizado no neurônio pré-sináptico. Assim, tem-se uma continuada produção e liberação deste neurotransmissor (figura 4) (ABREU-VILLAC, 2011).

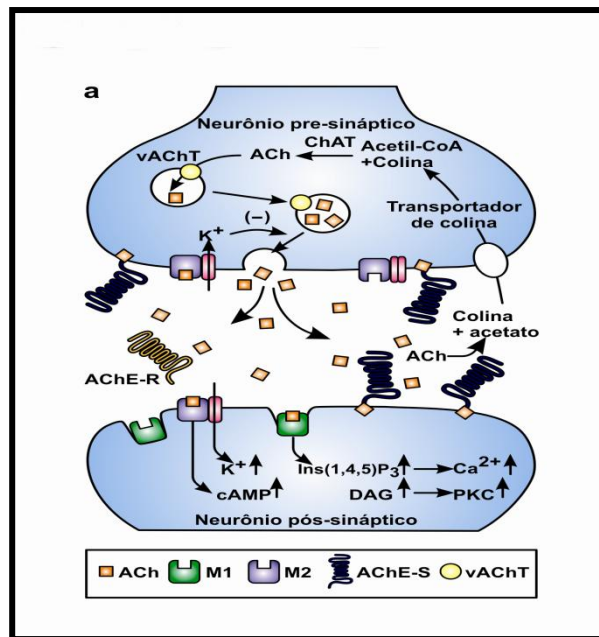


Figura 4: Esquema de uma sinapse colinérgica: Acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase sináptica (AChE-S), receptor muscarínico do tipo 1 (M1), receptor muscarínico do tipo 2 (M2), transportador de ACh vesicular (TACHV). Adaptado de Soreq & Seidman, (2001)

A enzima que hidrolisa o neurotransmissor ACh na fenda sináptica em colina e acetato é a enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima é uma serina hidrolase pertencente à família das esterases. Estudos tem demonstrado que essa enzima possui vários domínios importantes. Um desses domínios é o sítio ativo da AChE que situa-se na parte inferior de um estreitamento semelhante a uma garganta (gorge). Esse sítio ativo é formado por um sítio esterásico que contém a tríade catalítica, onde estão presentes os aminoácidos serina, a histidina e o glutamato ou aspartato e um sítio aniônico no qual ocorre a ligação com a parte catiônica do substrato, a ACh. Além disso, na borda ou superfície do gorge situa-se um segundo sítio de ligação chamado sítio aniônico periférico (PAS), o qual é responsável pela ligação de compostos que podem alterar a atividade da AChE (SILMAN, 2005). Esses sítios são responsáveis pela manutenção da atividade catalítica da enzima. Alguns inibidores como os organofosforados ligam-se exclusivamente ao sítio esterásico, enquanto outros que contém o grupo amônio quaternário similar a ACh ligam-se ao sítio aniônico. (JOHNSON, 1999).

Já é bem conhecido o importante papel da AChE como enzima atuante da sinapse colinérgica na hidrólise do neurotransmissor ACh, regulando os efeitos oriundos dessa molécula (MASSOULIÉ, 2008). Sabe-se que o sistema colinérgico e seus componentes estão envolvidos principalmente com o aprendizado e a memória, isso pode ser definido devido à

ação de anticolinérgicos - como escopolamina e a atropina que alteram a formação do aprendizado e da memória (NOBESHIMA, 1993). Além disso, estudos apresentam uma relação existente entre a formação da placa amilóide e os déficits cognitivos na doença de Alzheimer com a enzima AChE (REES, 2003). Nesse caso inibidores da AChE (AChEIs) são usados como terapia para essa desordem neurodegenerativa, promovendo reversão parcial e temporal dos déficits cognitivos (DAS, 2007).

Além disso, outra propriedade relacionada a essa enzima é descrita por Sternfeld (1998) onde mostra que AChE está relacionada tanto com a sinaptogênese quanto com o crescimento do neurito, por mecanismos diferentes, pois na sinaptogênese depende da capacidade hidrolítica da AChE sobre o neurotransmissor ACh e no neurito depende apenas da associação da enzima com a membrana. Além disso, outro estudo aponta que AChEIs podem inibir o crescimento do neurito em culturas celulares (GRISARU, 1999).

No DM uma deficiência de insulina sistêmica, o qual atua como um fator neurotrópico e um neurotransmissor peptidérgico, pode afetar o sistema colinérgico. A insulina pode exercer uma influência inibitória sobre os neurônios colinérgicos. Estudos com modelos de diabetes induzidos por STZ demonstram que pode haver um aumento da atividade da colina acetiltransferase (ChAT) na região central e no sistema nervoso periférico (WAHBA E SOLIMAN, 1988, WAHBA et al., 1992), bem como pode aumentar o efluxo de ACh a partir de neurônios parasimpáticos do coração (UCCIOLI et al., 1993). Outros efeitos observados no diabetes podem estar relacionados a um aumento na captação de β -hidroxibutirato pelo cérebro, o qual pode alterar o metabolismo da ACh (McCALL et al., 1982, WERNER et al., 1989), e também podem modificar o fornecimento de metabólitos de energia para a síntese de acetil-CoA no cérebro. Além disso, Szutowicz et al. (1994) demonstraram que terminais nervosos isolados de ratos diabéticos utilizam muito mais piruvato e β -hidroxibutirato, os quais levam a um aumento proporcional nos níveis de acetil-CoA e conseqüentemente a síntese de ACh. Um acúmulo excessivo na síntese e liberação de ACh pode ser um efeito característico na encefalopatia diabética.

O sistema colinérgico também pode estar envolvido com os processos de aprendizado e memória. A memória se caracteriza basicamente como a capacidade que temos de armazenar situações percebidas, e evocá-las posteriormente. São como uma espécie de identidade racional que nos possibilita diferenciar cada indivíduo pelo acervo de suas vivências (LENT, 2004; IZQUIERDO, 2002). Existem três fases para a formação da memória: a aquisição ou aprendizagem, a consolidação onde armazena-se a informação e a

evocação que é demonstrada pela lembrança do que foi armazenado (ABEL & LATTAL, 2001).

A memória pode ser classificada em dois tipos, as explícitas ou declarativas e as implícitas ou não-declarativas. A primeira se refere à memória evocada conscientemente e que pode ser verbalizada, que expressa a relação do indivíduo com o meio ou a própria percepção de si. Já a segunda é uma memória inconsciente, que expressa uma forma de condicionamento, uma evocação procedimental automatizada, ou seja, dificilmente definida em palavras (ALBRIGHT et al., 2000; LEES & JONES, 2000). A memória declarativa pode ser classificada em: memória imediata, a qual tem duração de um curto período de tempo, ela está relacionada ao córtex pré-frontal e memória de curta duração que tem duração de minutos a poucas horas, formando “traços” de memória. Já as memórias de longa duração são aquelas que podem ser evocadas por dias, meses e anos, e também formam “traços” de memória (IZQUIERDO et al., 1998).

Além disso, podemos destacar que para a formação da memória de longa duração ocorre a expressão gênica, síntese protéica e ativação de várias vias metabólicas que estão relacionadas com esse processo. Anteriormente aos processos citados, ocorre alteração na liberação de neurotransmissores que promovem a comunicação entre neurônios das principais estruturas envolvidos na formação de memória como hipocampo, o córtex e outras estruturas cerebrais (McGAUGH, 2000). Abel & Lattal (2001) sugerem que o córtex pode estar envolvido na consolidação ou recuperação de memórias extintas. Os eventos bioquímicos relacionados com a formação da memória podem ser regulados logo após uma sessão de aprendizado em animais, por meio de mecanismos hormonais e neuro-humorais relacionados ao estresse e à ansiedade, modulando sinapses gabaérgicas, noradrenérgicas e colinérgicas.

Um teste comumente utilizado para avaliar testes de memória é a esQUIVA INIBITÓRIA que se realiza em uma caixa contendo uma plataforma estreita localizada logo acima de uma grade metálica por onde passa uma corrente de alguns miliampères. Durante o treino, o animal é colocado na plataforma e quando ele desce para explorar o local, recebe um leve choque nas patas. Durante o teste, o mesmo procedimento é feito horas depois, sendo que, se analisa quanto tempo o animal leva para se encorajar a descer, isso se chama latência, que é a medida do quão retida foi a memória (SILVA, 2006).

A relação do sistema colinérgico com o aprendizado e a memória esta mais ligada com os sintomas e com o tratamento da doença de Alzheimer. Experimentos mais recentes focam subtipos específicos de receptores de ACh na mediação dos efeitos deste neurotransmissor na cognição. Estudos relatam que o bloqueio de receptor muscarínico de subtipo M1 de ACh está

associada com um prejuízo na memória (BYMASTER et al., 1993, OHNO et al., 1994) e que antagonistas do receptor M2 podem estar associados com uma melhora na memória, podendo até diminuir os efeitos de bloqueio do receptor M1, aumentando a liberação de ACh (BARATTI et al., 1993, BYMASTER et al., 1993). Antagonistas de receptores nicotínicos não parecem afetar a função cognitiva da mesma maneira como as drogas antimuscarínicas, mas a própria nicotina tem sido mostrada por melhorar os aspectos cognitivos, principalmente no estágio inicial da doença de Alzheimer (SAHAKIAN & COULL, 1994).

A condição diabética está associada com modificações na função cerebral, principalmente com déficit cognitivos através de muitos processos. Os déficits cognitivos podem estar relacionados com a hiperglicemia crônica, os quais causam alterações na plasticidade sináptica (BIESSELS, 2010). Além de também estar relacionado com a diminuição das concentrações de insulina no SNC. É conhecido que receptores de insulina são amplamente distribuídos no hipocampo e no córtex, e estão relacionadas a alterações no aprendizado e na memória (ZHAO & ALKON, 2001; BONDY e CHENG, 2004). Outros fatores contribuintes para essas alterações comportamentais pode-se citar a atrofia do hipocampo (CONVIT et al., 2003).

A ansiedade é essencialmente uma emoção normal, sendo estritamente relacionada com o medo. Em geral considera-se que o medo seja uma resposta provocada por um estímulo ou situação bem definidos, ou seja, um perigo real, enquanto a ansiedade surgiria em circunstâncias nas quais o perigo parece ser apenas potencial (CAMPOS, 2008). A ansiedade é uma experiência subjetiva, basicamente desagradável, que geralmente vem acompanhada de alterações dos níveis séricos de corticosteróides, tensão muscular, sudorese e sintomas psicológicos como aumento da vigilância, insônia e sentimentos de apreensão (GRAEFF, 1999).

Para melhor compreender como ocorre ou a forma como se desenvolve a ansiedade modelos de testes comportamentais tem sido propostos para estudá-la. Entre eles podemos destacar o labirinto em cruz elevada, o qual é baseado no medo inato dos animais principalmente a lugares altos e desprotegidos. O labirinto de cruz elevada é composto por dois braços fechados e dois braços abertos, e é elevado cerca de 40-50 cm do chão. O animal é colocado no centro da cruz, e é deixado livre para explorar durante um período determinado, normalmente cinco minutos. Dois índices de “ansiedade” são utilizados: a proporção de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados. Também se quantifica o total de entradas nos quatro braços. Nesse contexto, surgiram então as drogas ansiolíticas que atuam aumentando o tempo de exploração dos braços abertos (RUBIN, 2000).

A caracterização experimental da ansiedade levou ao conhecimento de circuitos cerebrais envolvidos na integração de seus componentes cognitivos e emocionais. Nesse sentido, inúmeras são as estruturas corticais e circuitos límbicos implicados nos mecanismos que modulariam os estados de ansiedade. É importante notar que alguns sistemas podem estar relacionados às manifestações de medo, dos quais podemos citar: projeções neuronais no hipocampo, tálamo, amígdala, conexões do córtex pré-frontal e outros núcleos subcorticais como o núcleo accumbens e o septo (CAMPOS, 2008). Em relação ao córtex pré-frontal (CPF), estudos têm demonstrado que lesões excitatórias no CPF aumentam a permanência de roedores nos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevada (SULLIVAN & GRATTON, 2001; BLANCO et al., 2009).

Além disso, o sistema colinérgico presente no CPF podem também estar relacionado com os processos de ansiedade, onde a hiperatividade desse sistema podem estar relacionado com o processo de medo (HASSELMO, 1995; BERNSTON et al., 1998; ACQUAS et al., 1996; 2001; MILLAN, 2003). Quando um antagonista M1 seletivo foi injetado no CPF em baixas doses, então um efeito do tipo ansiolítico foi observado no labirinto de cruz elevada, sugerindo a participação dos receptores M1 do CPF no controle da ansiedade (WALL et al., 2001; WALL & MESSIER, 2002).

Outro sistema comumente associado com a ansiedade é o sistema GABAérgico. Um dos componentes do desse sistema é o GABA, o qual é o maior neurotransmissor inibitório do SNC, é sintetizado a partir do glutamato, esse por sua vez tem a molécula de glicose como seu principal precursor. O neurotransmissor GABA atua em dois tipos de receptores: GABA_A e GABA_B. O tipo GABA_A é um receptor regulado por ligante enquanto o outro é um receptor acoplado a proteína G. Além disso, o GABA_A produz ação inibitória rápida bem como também podem atuar numa inibição mais lenta. A estrutura desse receptor é constituída de uma montagem pentamérica de diferentes subunidades sendo as principais a α , β e a γ , as quais podem ainda ocorrer em três ou mais isoformas, sendo que o efeito ansiolítico acontece nos receptores contendo a subunidade α_2 .

Os fármacos ansiolíticos benzodiazepínicos atuam potencializando seletivamente os efeitos do GABA nos receptores GABA_A. Eles se ligam com alta afinidade a um sítio acessório nesse receptor de modo que a afinidade da ligação do receptor com o neurotransmissor é aumentada. Assim agonistas como o diazepam reforçam a ação do GABA atuando como ansiolíticos enquanto que antagonistas como o flumazenil atuam como ansiogênicos (RANG et al., 2007).

Antony et al. (2010) demonstraram que os receptores GABA_A apresentam uma menor expressão em ratos diabéticos induzidos por STZ. Uma disfunção no sistema GABAérgico pode levar a uma diminuição nos mecanismos inibitórios no SNC e aumentar o quadro de convulsões, ou excitotoxicidade. Além disso, outros estudos demonstram que também pode ocorrer um aumento na liberação do neurotransmissor GABA (LEVIN & DUNN-MEYNELL, 1998) ou ainda uma diminuição na liberação desse neurotransmissor (GUYOT et al., 2001), estudos ainda são controversos. Em adição, uma diminuição na concentração de GABA pode ser uma consequência da inibição da atividade da enzima ácido glutâmico descarboxilase devido a um aumento na concentração de ATP intracelular na DM devido a hiperglicemia (MARTIN & TOBIN, 2000 apud GOMES & BARROS, 2003). Assim, compostos ansiolíticos atuam diretamente sobre os receptores GABA_A, revertendo as alterações ansiogênicas promovidos pela hiperglicemia (GOMES & BARROS, 2003).

Neste contexto, um crescente número de estudos epidemiológicos tem demonstrado a associação de compostos naturais, ou uma dieta mais natural no auxílio da cura de diferentes patologias. O consumo de compostos fenólicos está associado a uma variedade de efeitos benéficos para a saúde tais como: antioxidante, hipoglicêmica, hipolipidêmicas, anti-inflamatória, imunoestimulante, ansiolítica, neuroprotetora, entre outras (KONO et al., 1998; THOM, 2001; SANTOS et al., 2006; BOUAYED et al., 2007; BASSOLI et al., 2007).

Os compostos fenólicos são constituintes encontrados em muitas plantas que são amplamente consumidas em frutas, verduras, cereais e legumes, além disso, estão presentes em algumas bebidas tais como vinho, o chá e o café (FARAH & DONANGELO, 2006). Nas plantas esses compostos possuem atividades biológicas importantes sendo chamados de produtos do metabolismo secundário, eles são responsáveis por proteger contra ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microorganismos simbiotes. Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a UV e deficiência de nutrientes minerais. Os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Além disso, eles são sintetizados principalmente pela via do ácido chiquímico (SANTOS, 2007).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em duas classes de compostos: os derivados do ácido cinâmico e os derivados do ácido benzóico. Os derivados do ácido benzóico são encontrados em menores concentrações nos vegetais nas formas livres ou

também ligados a estruturas maiores como a de taninos. São exemplos conhecidos dessa classe o ácido gálico, o ácido elágico e o ácido 4-hidroxibenzóico. Os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados em maiores concentrações que os ácidos hidroxibenzóicos nas plantas em geral. Dentre esses, pode-se destacar os ácidos p-cumárico, caféico, ferrúlico e sináptico (Fig. 5). O ácido caféico é normalmente o polifenol hidroxicinâmico majoritário encontrado nas frutas, enquanto o ácido ferrúlico é mais encontrado nos cereais (MANACH, 2004; LAFAY & GIL-IZQUIERDO, 2008).

Esses compostos simples são raramente encontrados na forma livre, normalmente são encontrados esterificados com o ácido quínico, tartárico ou derivados de carboidratos. Os ésteres de ácido hidroxicinâmico e o ácido quínico são chamados de ácido clorogênicos (LAFAY & GIL-IZQUIERDO, 2008). Os ácidos clorogênicos (ACGs) são uma família de ésteres, os quais são encontrados em maior quantidade o 3-cafeolquínico, 4-cafeolquínico e o 5-cafeolquínico, este último muitas vezes é chamado simplesmente de ácido clorogênico. Pode-se encontrar também os di e tri conjugados do ACG como o di-cafeolquínico e tri-cafeolquínico, bem como podemos encontrar os conjugados do ácido ferrúlico como ferruloilquínico (AFQ). Todos esses compostos são conjugados dos ácidos hidroxicinâmicos livres encontrados nos alimentos (CLIFFORD, 1999).

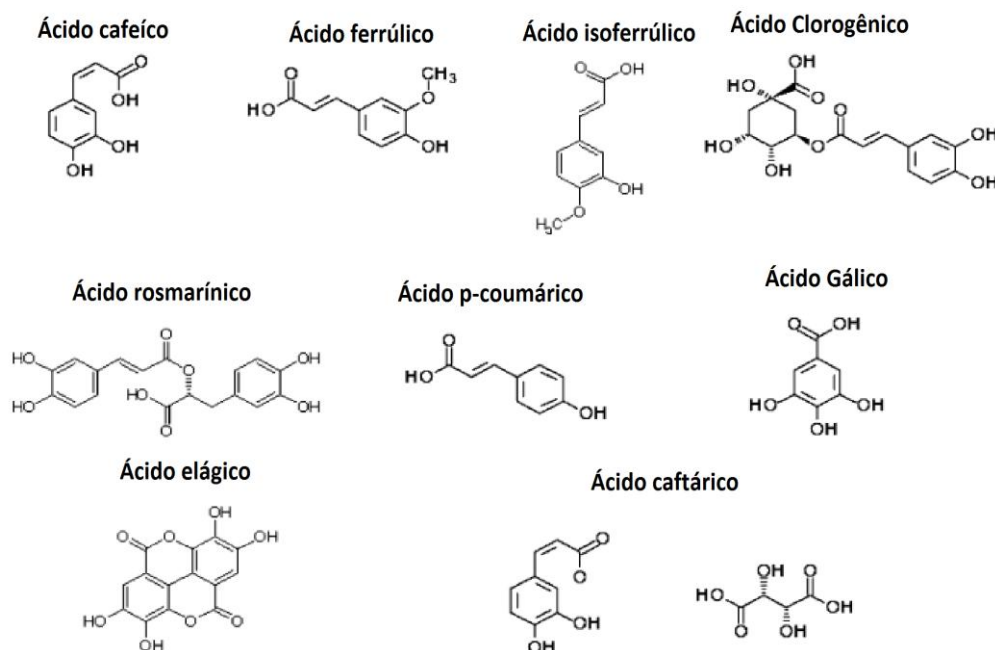


Figura 5: Principais estruturas de compostos fenólicos

Muitos estudos evidenciam que o ACG apresenta diversos papéis relacionados a benefícios a saúde humana, podendo ser útil na prevenção e tratamento de diferentes patologias (THOM, 2001; SANTOS et al., 2006; BASSOLI et al., 2007; BOUAYED et al., 2007). O ACG pode estar relacionado a funções hipoglicêmicas e hipolipídicas. Pois, postula-se que o ACG pode atuar reduzindo a glicemia pela diminuição da absorção intestinal de glicose (JOHNSTON et al., 2003). Esse composto ainda pode atuar inibindo a atividade da enzima glicose 6-fosfatase, ocasionando uma diminuição da liberação de glicose pelo fígado (BASSOLI et al., 2007). Outra descoberta atribuída ao ACG e mostrada por Sotillo e Hadley (2002) é atuação do ACG sobre o metabolismo de lipídios. Esses resultados mostram que a infusão de ACG administrado diariamente, por um período de três semanas, reduz o colesterol e os triglicerídios circulantes. No fígado, também, foi demonstrada uma diminuição na concentração desses lipídios em ratos tratados com ACG. Dessa forma, esse composto pode agir como um agente hipolipidêmico.

Além das propriedades antiglicêmicas e hipolipidêmicas o ACG pode atuar como uma molécula antiinflamatória. Sabe-se que o fator de necrose tumoral α é uma das moléculas mais atuantes no processo inflamatório, e estudos tem demonstrado que o ACG pode inibir a síntese ou liberação dessa molécula juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias (KRAKUER, 2002; SANTOS et al., 2006). Outra propriedade amplamente estudada é a ação antioxidante apresentada pelo ACG devido a sua atuação sobre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estudos demonstram que esse composto fenólico atua ligando-se e inativando rapidamente o radical hidroxila (OH) e outros radicais formados nos processos biológicos do organismo (KONO et al., 1998).

Além disso, em modelos animais de ansiedade, o ACG mostrou-se capaz de atuar como uma substância ansiolítica. E neste mesmo estudo mostrou-se que esse composto pode agir como um agonista dos receptores benzodiazepínicos, pois seu efeito é bloqueado com o flumazenil, um conhecido antagonista destes receptores (BOUAYED et al., 2007).

Dessa forma, demonstra-se que o ACG possui importantes atividades em nível periférico, atuando na glicemia e alterando o perfil lipídico em ratos (BASSOLI et al., 2007; SOTILLO & HADLEY, 2002), bem como participando da inflamação (SANTOS et al., 2006) e neuroproteção (BOUAYED et al., 2007). Além disso, pode atuar em todo o sistema orgânico como uma molécula antioxidante (KONO et al., 1998). Entretanto, muitos dos mecanismos relacionados aos efeitos benéficos do ácido clorogênico precisam ser melhor elucidados.

Os efeitos benéficos desse composto na saúde humana são muito estudados bem como a sua absorção e destino aos órgãos alvo. Olthof et al. (2003) sugerem que a absorção do ácido clorogênico pode se dar de duas maneiras: 1) em menor quantidade pelo intestino delgado, pois pequenas concentrações foram encontradas de ACG na forma intacta na urina ou também esse polifenol pode sofrer os mecanismos de conjugação no fígado; 2) o segundo mecanismo proposto para absorção do ACG é via o cólon passando por uma hidrólise microbiológica e então esses produtos de degradação seriam absorvidos e dariam origem ao ácido hipúrico, que é o principal metabólito encontrado na urina através da absorção do ACG (figura 6). Em relação a atingir os órgãos-alvo, Manach (2004) mostra que os polifenóis são aptos a penetrar nos tecidos; estudos in vitro mostram também que os flavonóides da dieta podem penetrar através da barreira hemato-encefálica.

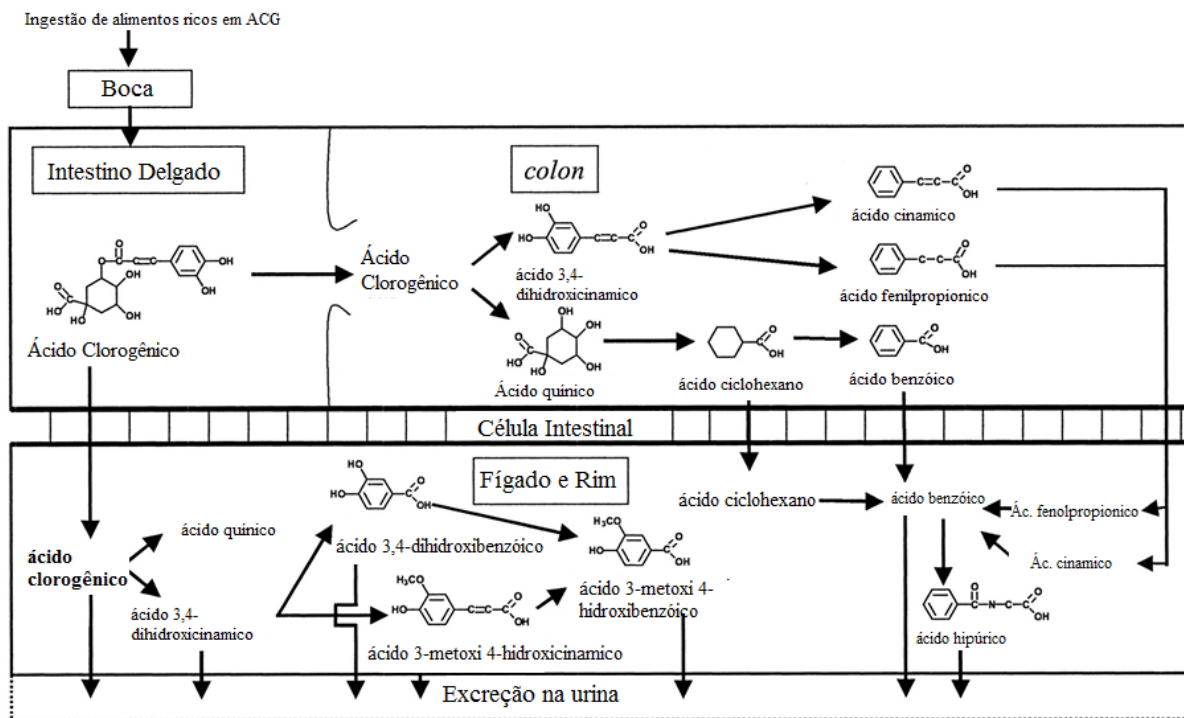


Figura 6. Mecanismo proposto por Olthof et al. (2003) para absorção e metabolização do ACG em humanos.

Como descrito anteriormente, o ACG é o maior composto fenólico presente no café, sendo que é encontrado em cerca de 14% nos grãos de café verdes, o qual influencia na determinação da qualidade do café e tem importante papel no seu sabor (FARAH & DONAGELO, 2006). Além disso, o ACG no café tem importante função relacionada ao controle da germinação da semente e crescimento celular através do controle do hormônio do

crescimento da planta (GRIFFIN & STONIER, 1975 apud FARAH & DONAGELO, 2006). Como citado anteriormente, as concentrações de ACG podem variar muito de acordo com o processo ao qual o grão do café for submetido. Além disso, Clifford (1999) destaca que em média no café mais escuro em 200 mL da bebida tem 20 mg de ACG, enquanto que no café mais claro tem em média 600 mg de ACG. Ainda, na espécie *Coffea arabica* há cerca de 70-385 mg de ACG cada 200 mL de café.

O café é a bebida mais consumida em todo o mundo. Assim, existem muitos estudos demonstrando seus efeitos biológicos na saúde humana. Alguns estudos tem associado o consumos do café com o risco de desenvolvimento do DM tipo 2 enquanto outros tem associado a uma prevenção dessa patologia. Contudo, os estudos indicam que os efeitos do café dependem principalmente da quantidade diária ingerida (DAM, 2006; BONITA, 2007; HIGDON & FREI, 2007). Além disso, o consumo do café pode estar relacionado a outros hábitos que poderiam estar mais relacionados ao maior risco do desenvolvimento do DM, tais como o consumo de cigarro (DAM, 2006). Alguns estudos demonstram que o consumo do café pode estar relacionado com o prejuízo na tolerância à glicose, bem como na diminuição da sensibilidade à insulina (GREEMBERG et al., 2006, HIGDON & FREI, 2007).

Além do DM, alguns estudos indicam que o consumo de café pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV) devido ao consumo deste produto aumentar os níveis séricos de colesterol-LDL, bem como aumentar as concentrações plasmáticas de homocisteína, a qual é relacionada com o desenvolvimento da doença coronariana. O consumo de café também pode estar ligado ao aumento da pressão arterial, outro fator contribuinte para o desenvolvimento da DCV (HIGDON & FREI, 2007). Contudo, Greemberg (2006) discute que o consumo de café pode estar relacionado à saciedade, o qual reduziria o consumo de alimentos diminuindo o peso. Em adição, o consumo dessa bebida pode estar associado a uma diminuição da perda cognitiva em mulheres de idade avançada (JOHNSON-KOZLOW et al., 2002).

A maioria dos efeitos do café está associado principalmente à cafeína (CA), a qual é o alcalóide em maior concentração no café. Os alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos que também podem atuar na defesa contra o ataque de microorganismos e na proteção contra a radiação ultravioleta (HENRIQUES et al., 2007). Devido à ampla origem dos muitos compostos presente na classe dos alcalóides, eles podem ser classificados levando-se em consideração os principais núcleos que dão origem a esses compostos.

As metilxantinas mais comuns são a cafeína, a teofilina e a teobromina. São sintetizadas a partir de bases purínicas livres, como hipoxantina, adenina, guanina e também nucleosídeos (GOODWIN & MERCER, 1975). De forma sucinta essas bases purínicas irão gerar a xantosina, a qual é metilada para gerar xantinas metiladas como a teobromina (3,7-dimetilxantina) e a cafeína (1,3,7-trimetixantina)(RATES, 2007). As metilxantinas, em especial a cafeína, possuem um amplo espectro de atividades biológicas descritas na literatura.

A cafeína possui diferentes mecanismos de ação: 1) Antagonista dos receptores de adenosina. É conhecido que baixas doses de cafeína plasmática entre 2 até 20 μM , ou seja, concentrações estas que são comumente consumidas podem exercer efeito bloqueando esses receptores, principalmente $A_1\text{R}$ e $A_{2A}\text{R}$. Esses receptores são encontrados em altas concentrações em muitos tecidos celulares. No cérebro, por exemplo, $A_1\text{R}$ são encontrados em altas concentrações no hipocampo, córtex e cerebelo, enquanto que o $A_{2A}\text{R}$ é mais numeroso nas regiões ricas em neurônios dopaminérgicos como núcleo accumbens e putamem. $A_1\text{R}$ tem o papel de controlar a liberação de neurotransmissores excitatórios e $A_{2A}\text{R}$ juntamente com $A_1\text{R}$ são responsáveis também pelo controle da ansiedade. 2) Inibição das fosfodiesterases controlando os níveis de AMPc, nas células. Esse efeito somente é observado em concentrações plasmáticas de cafeína superiores a 20 μM . Dessa forma no SNC esses efeitos não são muito considerados. 3) Da mesma forma que a inibição das fosfodiesterases, em altas concentrações a cafeína pode atuar nos canais de cálcio aumentando a liberação de íons cálcio. Esse efeito é observado na contração muscular, onde a cafeína favorece a liberação de cálcio intracelular, também é observado nas células beta pancreáticas, onde a cafeína aumenta a liberação de cálcio (DALY & FREDHOLM, 2004).

Em adição, periféricamente a cafeína pode atuar aumentando a liberação de epinefrina, o qual pode ser responsável pelo efeito relacionado à redução da sensibilidade à insulina e ao aumento da tolerância à glicose. Outros estudos mostram que a cafeína também pode atuar aumentando os ácidos graxos livres na circulação (CHENG et al., 2000). Além disso, a cafeína pode causar alteração na resposta das plaquetas à adenosina e reduzir a agregação plaquetária, devido ao up-regulação de receptores A_2A presentes na superfície das plaquetas (VARANI et al., 2000).

É conhecido que a cafeína é um composto que pode atravessar a barreira hematoencefálica e exercer muitos efeitos no SNC. Esse alcalóide é rápida e quase completamente absorvido no estômago e intestino delgado e se distribuí para todos os tecidos, incluindo o cérebro. O metabolismo da cafeína ocorre principalmente no fígado, onde a enzima citocromo

P450 isoforma CYP1A2 é responsável por quase 95% do metabolismo principal da cafeína. CYP1A2 catalisa a 3-desmetilação da cafeína resultando na formação de 1,7-dimetilxantina (paraxantina). A paraxantina pode ser desmetilada pelo CYP1A2 para formar 1-metilxantina, que pode ser oxidada a ácido 1-metilúrico pela xantina oxidase. Paraxantina pode também ser hidroxilada por CYP2A6 para formar ácido 1,7-dimetilúrico, ou ser acetilada pela N-acetiltransferase 2 (NAT2) para formar 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo, um composto instável que pode ser desformilado não enzimaticamente para formar 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracilo (Figura 7)(KRUL & HAGEMAN, 1998; CREWS et al., 2001). Em adição, a paraxantina é o principal metabólito encontrado no sangue após a ingestão de cafeína, contudo ainda podem ser encontrados como metabólitos ativos da cafeína: a teofilina e a teobromina (DALY, 1993).

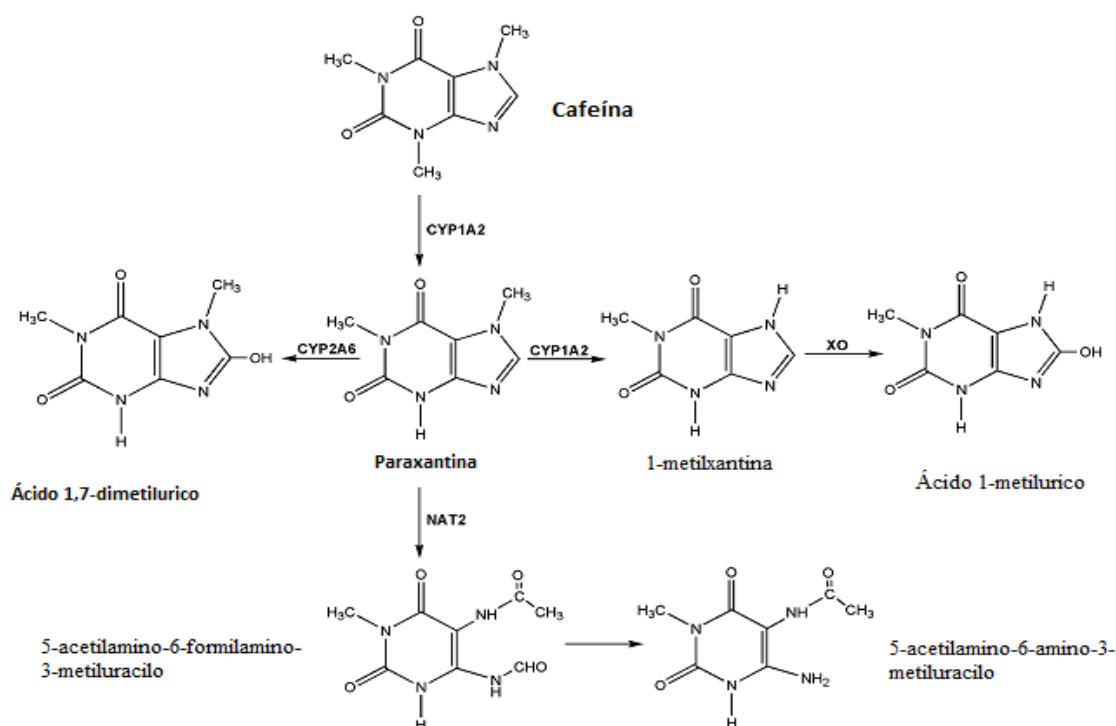


Figura 7: Via do metabolismo da cafeína: no qual (CYP1A2) citocromo P450 1A2; (CYP2A6) citocromo P450 2A6; (NAT2) N-acetiltransferase 2; (XO), xantina oxidase. Adaptado de Krul and Hageman, 1998.

A cafeína é encontrada em muitas plantas principalmente aquelas com características estimulantes como o café, o chá preto, o guaraná entre outras. Podemos destacar como principal fonte de cafeína é o café. A quantidade de cafeína em café é dependente de uma série de fatores como a variedade da planta, método de cultivo, condições de crescimento, além de aspectos genéticos e sazonais. No caso da bebida, por exemplo, além da quantidade de pó, influenciam também o tipo do produto (torrado ou instantâneo, descafeinado ou

regular) e o processo utilizado no seu preparo (BARONE & ROBERTS, 1984). Estudos têm demonstrado que a quantidade da cafeína nesta bebida pode ser bem variável. Uma xícara de café (150 mL) contém cerca de 30-150 mg de cafeína (GILBERT et al., 1976).

Neste contexto, tendo em vista os inúmeros efeitos benéficos do café e seus componentes na saúde humana, torna-se relevante avaliar parâmetros oxidantes e comportamentais como memória e ansiedade, bem como a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, δ -ALA-D, e AChE em córtex cerebral de ratos diabéticos induzidos por STZ e tratados com ácido clorogênico, cafeína e café.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o efeito do ácido clorogênico, cafeína e café sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos diabéticos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a peroxidação lipídica em córtex cerebral de ratos diabéticos tratados com ácido clorogênico, cafeína e café;
- Determinar o efeito do ácido clorogênico, cafeína e café na atividade da δ -ALA-D em córtex cerebral de ratos diabéticos tratados com estes compostos;
- Avaliar a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos diabéticos tratados com ácido clorogênico, cafeína e café;
- Analisar o efeito do ácido clorogênico, cafeína e café na atividade da AChE em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos diabéticos tratados com estes compostos;
- Analisar alterações na memória e ansiedade dos ratos diabéticos e tratados com o café e seus componentes;

3. MANUSCRITO

3.1 Manuscrito 1:

Efeito do ácido clorogênico, cafeína e café em parâmetros bioquímicos e comportamentais de córtex cerebral de ratos diabéticos

Naiara Stefanello¹, Roberta Schmatz¹, Luciane Belmonte Pereira¹, Maribel A. Rubin¹, João Batista Teixeira da Rocha¹, Graziela Facco¹, Maria Ester Pereira¹, Cinthia Melazzo Mazzanti², Sabina Passamonti³, Marília Valvassori¹, Fabiano Barbosa Carvalho¹, Michelle Melgarejo Rosa¹, Fátima Hussein Abdala¹, Vera Maria Morsch¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{1,2*}

Submetido à revista Neurochemical Research

Effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats

Naiara Stefanello¹, Roberta Schmatz¹, Luciane Belmonte Pereira¹, Maribel A. Rubin¹, João Batista Teixeira da Rocha¹, Graziela Facco¹, Maria Ester Pereira¹, Cinthia Melazzo Mazzanti², Sabina Passamonti³, Marília Valvassori¹, Fabiano Barbosa Carvalho¹, Michelle Melgarejo Rosa¹, Fátima Hussein Abdala¹, Vera Maria Morsch¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{1,2*}

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

² Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Setor de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

³Department of Life Sciences, University of Trieste, via L. Giorgieri 1, 34127, Trieste Italy.

* Corresponding author:

Address correspondence and reprint requests to:

Maria Rosa ChitolinaSchetinger (mariachitolina@gmail.com)

Tel: + 55-55-3220-9557

Fax: + 55 55 32208978

Abstract

Diabetes mellitus is associated with brain alterations that may contribute to cognitive dysfunctions. Chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) are natural compounds that have showed important actions in the brain. The present study aimed to evaluate the effect of CGA, CA and CF on acetylcholinesterase (AChE), Na⁺, K⁺-ATPase and Aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activities, TBARS levels from cerebral cortex, as well as memory in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Animals were divided into eight groups (n=6–13): Control; Control/CGA 5 mg/kg; Control/CA 15 mg/kg; Control/CF 0.5g/kg; Diabetic; Diabetic/CGA 5 mg/kg; Diabetic/CA 15 mg/kg e Diabetic/CF 0.5 g/kg. Twenty nine days after treatment with the compounds animals were submitted to behavioral tests. Animals were then submitted to euthanasia and the cerebral cortex was collected. Our results have demonstrated that the AChE activity and TBARS levels were increased in cerebral cortex, while δ -ALA-D and Na⁺, K⁺-ATPase activities were decreased in the diabetic rats when compared to the control group. Furthermore, diabetic rats showed deficit in memory and increase en the anxiety. The treatment with CGA and CA prevented the increase in the AChE activity in diabetic rats when compared to the diabetic group. CGA, CA and CF intake restored partially the cerebral δ -ALA-D and Na⁺, K⁺-ATPase when compared to the diabetic group. Moreover, CGA prevented diabetes-induced TBARS production, improved the memory and decrease the anxiety. Our results showed that CGA, CA and CF can modulate cerebral oxidative stress as well as δ -ALA-D and Na⁺, K⁺-ATPase activities in a model of diabetes type I. Consequently, we can suggest that these compounds mainly the CGA, which has the better effect, could modulate oxidative stress associated with the diabetic pathology.

Keywords: caffeine, Chlorogenic acid, coffee, Diabetes Mellitus, memory.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by a complete inability to synthesize and release insulin endogenously or by the presence of "insulin resistance" followed by a progressive decrease of β cell function [1]. An increase of glucose concentration in blood may produce high levels of free radicals by autoxidation of glucose and by protein glycation [2] as well as may generate damage in several tissues including kidney, liver and mainly central nervous system (CNS). The damage showed in the CNS is characterized by cognitive and electrophysiological dysfunctions [3, 4].

It has been demonstrated that hyperglycemia induces oxidative stress [5,6,7] in various brain regions and also changes activities of enzymes that are considered important to the normal CNS functioning, such as δ -ALA-D, Na^+ , K^+ -ATPase, AChE, among others [8,9].

Aminolevulinate acid dehydratase (δ -ALA-D), also known as porphobilinogen synthase, is the second enzyme of the heme pathway. This enzyme catalyzes the condensation of two molecules of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA), yielding to the monopyrrole product porphobilinogen [10, 11]. Data have showed that δ -ALA-D can be altered in the hyperglycemia and oxidative stress conditions [11-13]. In fact, δ -ALA-D has vicinal thiol groups in the active center that are easily oxidized, rendering the enzyme extremely sensitive to pro-oxidant agents or situations (for review see 11). Na^+ , K^+ -ATPase is a transmembrane enzyme primarily involved in the active transport of sodium and potassium ions in cells [14]. The enzyme is highly expressed in neurons and maintains the electrical potential necessary for neuronal excitability [15,16]. Studies have demonstrated that the decrease of the Na^+ , K^+ -ATPase activity is an early alteration found in experimental diabetic neuropathy [17,18]

Acetylcholinesterase (AChE) hydrolyzes the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the synaptic cleft of the cholinergic neuron. Physiologically, the AChE modulation is involved

in neurite growth, synaptogenesis, and activation of dopaminergic neurons in specific regions of the CNS [19]. Studies have showed that the AChE activity is increased in several pathologies such as demyelization models [20], in diabetic patients, as well as in STZ-induced diabetic rats [4]. In addition, the increase in the AChE is associated with deficiencies in learning and memory [21].

Epidemiological studies have associated the consumption of coffee and their components with a wide variety of health beneficial effects, in particular the reduced risk of DM [22-24]. These beneficial effects have been attributed mainly to the phenolic compounds present in coffee. Phenolic compounds (Chlorogenic acid - CGA) and alkaloid (Caffeine - CA) are the main compounds found in this beverage. CGA has showed to exert a number of important biological activities including the modulation of glucose [25] and lipid metabolism [26] as well as antioxidant [27], anti-inflammatory [28], hepatoprotective [29] and neuroprotective proprieties [30]. Furthermore, CA blocks the adenosine receptors in the CNS increasing the release of excitatory neurotransmitters [31].

In contrast to cerebral effects, little is known about the effect of CGA, CA and CF as potential protective agents against the neurotoxicity associated with diabetic conditions in rats. In this context, considering that DM causes neurotoxic effects in the CNS and that high coffee consumption has been associated with a beneficial effect in the DM, the aim of this study was to evaluate the effects of CGA, CA and CF on AChE, Na⁺, K⁺-ATPase and δ -ALA-D activities, which play critical roles in the modulation of proper brain function. Behavioral changes and their relationship to the pathology of DM have also been assessed.

2. Materials and Methods

Chemicals

Acetylthiocholineiodide, Percoll, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tris (hydroxymethyl)-aminomethane GR, Coomassie brilliant blue G, Nucleotides, Trizma, streptozotocin, chlorogenic acid, caffeine, (approximately 99% purity) were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity. Coffee used in the test was 100% Coffee arabica, soluble and lyophilized coffee with 30% of CA per gram of coffee analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The dose to CGA was determined in accordance with literature data [75].

Animals

Adult male Wistar rats (70–90 days; 220–300 g) from the Central Animal House of the University Federal of Santa Maria (UFSM) were used in this experiment. Animals were maintained at a constant temperature ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria (protocol under number: 23/2011).

Experimental induction of diabetes

Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin (STZ) diluted in 0.1 M sodium-citrate buffer (pH 4.5). [74]. Age-matched control rats received an equivalent amount of sodium-citrate buffer. STZ-treated rats received 5% of glucose instead of water for 24 h after diabetes induction in order to reduce death due to hypoglycemic shock. Blood samples of the rats in fasting were taken from the tail vein 7 days

after STZ or vehicle injection. Glucose levels were measured with a portable glucometer (ADVANTAGE, Boehringer Mannheim, MO, USA). Only animals with fasting glycemia over 250 mg/dl were considered diabetic and used for the present study.

Treatment with chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF)

Animals were randomly divided into eight groups (ten rats per group): I - Control (water); II – chlorogenic acid (5 mg/kg); III – caffeine (15 mg/kg); IV- coffee (0.5 g/kg); V- Diabetic (water); VI - Diabetic (chlorogenic acid 5 mg/kg); VII - Diabetic (caffeine 15 mg/kg); VIII - Diabetic (coffee 0.5 g/kg). One week after diabetes induction, animals belonging to groups II and VI received for gavage 5 mg/kg of CGA; animals of groups III and VII received 15 mg/kg of CA; animals of groups IV and VIII received 0.5 g/kg of coffee; whereas animals of groups I and V were treated with saline solution. CGA was freshly prepared in water and CA. Coffee was solubilized in hot water and administered between 8 and 9 a.m. every day for 29 days, at a volume not exceeding 0.1 ml/100g rat weight.

Behavioral procedure

Inhibitory avoidance

Briefly, the rats were subjected to a single training session in a step-down inhibitory avoidance apparatus, which consisted of a 25×25×35-cm box with a grid floor whose left portion was covered by a 7×25-cm platform, 2.5 cm high. The rat was placed gently on the platform facing the rear left corner, and when the rat stepped down with all four paws on the grid, a 2-s 0.4-mA shock was applied to the grid. Retention test took place in the same apparatus 24 h later. Test step-down latency was taken as a measure of retention, and a cut-off time of 500 s was established according to [32].

Open field

Immediately after the inhibitory avoidance test session, animals were transferred to an open-field measuring 56×40×30 cm with the floor divided into 12 squares measuring 12×12 cm each. The open field session lasted for 5 min and during this time an observer who was not aware of the pharmacological treatments recorded the number of crossing responses and rearing responses manually. This test was carried out to identify motor disabilities, which might influence inhibitory avoidance performance at testing.

Elevated plus maze task

Anxiolytic-like behavior was evaluated using the task of the elevated plus maze as previously describe [33, 34]. The apparatus consists of a wooden structure raised to 50 cm from the floor. This apparatus is composed of 4 arms of the same size, with two closed-arms (walls 40 cm) and two open-arms. Initially, the animals were placed on the central platform of the maze in front an open arm. The animal had 5 minutes to explore the apparatus. Was recorded the time spent and the number of entries in open and closed-arms. The apparatus was thoroughly cleaned with 30% ethanol between each session.

Brain tissue preparation

After behavioral tests, animals were first submitted to euthanasia being previously anesthetized with halothane. The cerebral cortex was collected for AChE assay in synaptosome and δ -ALA-D, Na⁺, K⁺-ATPase, TBARS levels in the supernatant 1.

Homogenate Preparation

Cortex cerebral (CC) was immediately removed and placed in solutions according to the technique to be measured, based on the methods described below.

TBARS assay

CC was diluted with a solution of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, on ice, and homogenized in a glass potter in Tris-HCl solution. The homogenate was centrifuged at 2000 g for 10 min to yield the low speed supernatant (S1) that was used immediately for TBARS assay. Subsequently, the lipidic peroxidation assay was accomplished by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using the method described previously by [35].

δ -ALA-D assay

Cerebral δ -ALA-D activity was assayed according to the method of [36] by measuring the rate of porphobilinogen (PBG) formation. ALA-D activity was expressed as nmolporphobilinogen (PBG)/mg protein/h.

Na⁺, K⁺-ATPase assay

Na⁺, K⁺-ATPase activity was measured as previously described [37] with minor modifications [38]. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified colorimetrically as previously described [39] using NaH₂PO₄ as reference standard. Specific Na⁺, K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nmol of Pi/min/mg of protein.

Synaptosome preparation

The brain was dissected into cerebral cortex, which was then homogenized in Medium I buffer pH 7.5. Synaptosomes of these structures were prepared as described by [40] using a discontinuous Percoll gradient. The synaptosomal integrity was measured by the assay of lactate dehydrogenase as described by [41].

Determination of the AChE activity

The AChE activity in synaptosomes from cerebral cortex was determined spectrophotometrically by the modified method of [42] as previously described [43]. The AChE activity was measured by increasing absorbance at 412 nm. This activity was expressed in $\mu\text{molAcSCh/h/mg}$ of protein.

Glucose levels

The glucose levels were determined in serum by using commercial Kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil). Which the glucose is oxidized with reagents from kit and antipirilquinonimina forming a red color with a intensity proportional to the concentration of glucose in the sample.

Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to [44] using serum albumin as standard.

Statistical Analysis

Two-way ANOVA was used for the statistical analysis, followed by Bonferroni post-test. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in both analyses used. Data were expressed as mean \pm SEM. Interactions were only presented when significant. Statistical analysis of number of closed and open arm entries and step-down latencies was carried out by the Scheirer–Ray–Hare extension of the Kruskal–Wallis test (nonparametric two-way ANOVA).

3 RESULTS

3.1. Blood glucose and body weight

Body weight values determined in the beginning of the treatment (after STZ-induction) and in the end of the experiment are presented in Table 1. The body weight from the diabetic group was significantly decreased when compared to the control group. When diabetic rats were treated with CGA (5 mg/kg), CA (15 mg/kg) and CF (0.5 g/kg), no changes in the body weight were observed in comparison to the diabetic group.

Blood glucose levels determined at the end of the treatment is presented in Table 2. As can be observed, blood glucose levels in the diabetic group were significantly increased when compared to the control group. The treatment with CGA (5 mg/kg), CA (15 mg/kg) and CF (0.5 g/kg) in the diabetic rats had no effect in the glucose blood levels, which remained elevated in relation to the control group. Similarly, when administered *per se* the compounds CGA, CA and CF did not present any effect on the glucose levels.

3.2. TBARS levels

Results obtained for TBARS levels in the cerebral cortex are presented in Fig.1. Post hoc test demonstrated that there was a significant increase in TBARS levels of the diabetic group when compared to the control group [$F(1,24) = 7.422$; $P=0.0118$]. CGA-treated diabetic group presented a decrease in TBARS levels when compared to the diabetic group. Diabetic rats treated with CA and CF did not present alterations in the TBARS levels, which remained elevated in relation to the control group.

3.3. δ -ALA-D and Na^+ , K^+ -ATPase assay

Results of the δ -ALA-D activity are presented in Fig.2. The δ -ALA-D activity was significantly decreased in the diabetic group when compared to the control group [$F(1,28) = 78.30$; $P<0.0001$]. Diabetic groups treated with CGA ($P<0.01$), CA ($P < 0.05$) and CF ($P<0.001$) showed a significant partial increase in the enzyme activity compared with the diabetic group treated with water. The control group treated with CF was the only group that showed an increase ($P<0.05$) in the δ -ALA-D activity when compared with the control group.

Results of the Na^+ , K^+ -ATPase activity are presented in Fig. 3. There was a significant decrease in the Na^+ , K^+ -ATPase activity in diabetic rats compared with the control group [$F(1,58) = 6.197$; $P=0.0152$]). However, the treatment with CGA, CA and CF prevented the decrease in the Na^+ , K^+ -ATPase activity when compared with the diabetic group treated with water [$F(1,58) = 8.424$; $P=0.0001$]. No changes in the control groups treated with CGA, CA and CF were observed.

3.4. AChE activity

Results obtained for the AChE activity in synaptosomes from cerebral cortex are presented in Fig.4. Statistical analysis showed a significant control or diabetic x water or

treatment (CGA, CA or CF) interaction [$F(3,57) = 6.316$; $P=0.0009$]. Post hoc test revealed that diabetic rats exhibited a significant increase in the AChE activity when compared to the control group ($P < 0.05$). The diabetic group treated with CGA 5 mg/kg ($P < 0.01$) and CA 15 mg/kg ($P < 0.05$) significantly decreased the AChE activity when compared to the diabetic groups treated with water. In non-diabetic groups, treatments with CGA, CA and CF did not change the AChE activity.

3.5 Inhibitory avoidance and open-field

Figure 5 shows the step-down latencies. Statistical analysis (Scheirer–Ray–Hare extension of the Kruskal-Wallis test) revealed a significant effect of treatment $H(7) = 22.58$; $P < 0.01$, revealing that the treatment with CGA reversed the decline of memory induced by diabetes. However, CA and CF did not change the impairment in memory caused by diabetic condition. Statistical analysis of open-field data (one-way ANOVA) revealed that the pharmacological treatment with CGA, CA and CF did not alter the number of crossing ($P > 0.05$) or rearing ($P > 0.05$) responses in a subsequent open-field test session, suggesting that neither STZ-induced diabetes nor the treatment with the substances caused gross motor disabilities at testing (date not shown).

3.6 Anxiolytic-like behavior

Figure 6 showed the anxiolytic-like behavioral. Treatments with coffee and diabetes significantly increased the number of closed arm entries (Fig 6A, $P < 0.05$) demonstrating anxiogenic-like effect of coffee and diabetes. In the graph 6B, CF, CA, and diabetes showed an anxiogenic-like effect due to the increased time in the closed arms. However, CGA although not having effect per se, blunted the anxiogenic-like effect induced by diabetes. Treatments with coffee and diabetic rats significantly reduced the time in center indicated an anxiogenic-like effect (Fig 6C), whereas CGA blunted the anxiogenic-like effect induced by

diabetes. Figure 6D shows the anxiogenic effect of coffee and diabetes since both treatments reduced the time in open arm. However, the treatments with polyphenolic compounds were not able to prevent the anxiogenic effect induced by diabetes. Figure 6E shows no changes in the total number of entries in the open and closed arms in any groups tested, indicating that there were no changes in the locomotor activity in the animals studied.

4. Discussion

It is known that hyperglycemia in diabetes can lead to an increase in reactive species caused damage to many tissues [45]. Based on our results, it is possible to suggest that there is an increase in the oxidative stress due to the increase in the TBARS levels (Fig.1) as well as the reduction in δ -ALA-D (Fig. 2) and Na^+ , K^+ -ATPase (Fig.3) activities. Several studies have demonstrated that the autoxidation of the glucose and/or the non enzymatic glycation of protein lead to the formation of a Schiff's base, which increase the production of reactive species and contribute to an increase in the oxidative stress [46, 47]. Glycation and carbonylation may inactivate enzymes especially those dependent on the SH groups. Thus, the decrease in the δ -ALA-D activity found in our study could be due to a glycation or carbonylation in the lysine residue by the aldehyde group present in glucose. Furthermore, the inhibition of the δ -ALA-D activity may promote an increase in the concentration of δ -ALA, which is a pro-oxidant agent, resulting in a greater increase in oxidative stress [47,11].

Another aspect to be discussed is that the decrease observed in Na^+ , K^+ -ATPase in this study can be associated with a possible glycosylation in the B subunit of this enzyme, as well as with the increase in the generation of the reactive species leading a destabilization of plasmatic membrane. Changes in the membrane structure could contribute to disrupt the activity of pumps involved with the transport of cations in the CNS [17]. Moreover, the brain

has poorer antioxidant defense system than other body tissues especially in the amount of antioxidant enzymes [48].

In our study, the treatment with CGA, CA and CF restored the Na^+ , K^+ -ATPase and δ -ALA-D activities in the brain of diabetic rats (Figs 2 and 3). In addition, only CGA was able to reduce TBARS levels in the brain of diabetic rats (Fig 1). In fact, some studies have shown that CGA and CA react with free radicals producing compounds that are rapidly converted to new and stable products [49-51]. Thereby, it is plausible to suggest that CGA, CA and CF could decrease the oxidative stress caused by high glucose levels and consequently to prevent alterations in important enzymes. In addition, preservation of ionic homeostasis due to the prevention of a decrease in the Na^+ , K^+ -ATPase activity could contribute to the electrical stabilization of the cell membrane and thereby contribute to the improvement in the release of neurotransmitters [8].

Our results showed that the AChE activity in the cerebral cortex (Fig 4) was significantly increased in the diabetic rats corroborating results found in other studies [4,9]. This increase in the AChE activity could be associated with high levels of glucose or with insulin deficit, adverse effects in the cholinergic system. In addition, Szutowicz et al. (1996) showed that the alterations in the cholinergic neurons could be associated with an accumulation of acetyl-CoA from fatty acid metabolism, an increase of the ketonemia in nerve terminals, as well as hyperglycemia. It is important to note that the Acetyl-CoA is involved in ACh synthesis and therefore an increase in the levels of this molecule could contribute to increase the synthesis and release of the ACh. Consequently, it could result in an increase in the AChE activity in diabetes. In addition, inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase in the brain may lead to diverse harmful effects such as partial membrane depolarization in the neurons, cell swelling, increased influx of Ca^{2+} , and excitotoxicity [53], which are factors that can contribute to a possible increase in the ACh release.

On the other hand, the treatment with CGA and CA prevented the increase in the AChE activity in synaptosomes of the cortex cerebral when compared with the diabetic group (Fig 4). These results are similar to those found in studies with other antioxidants such as resveratrol, curcumin, rutin, and lycopene [21, 54-56] that also prevented the rise in the AChE activity. In line with this, we can suggest that the antioxidant properties of CGA may be responsible for preventing the cholinergic dysfunction in diabetic rats. In fact, studies have demonstrated that alterations in the AChE activity may be induced by the increased free radical formation in the diabetic state which can provoke lipid peroxidation of cerebral membranes and cause changes in the conformational state of the AChE molecule and consequently in its activity. In our study the CGA was able to reduce the levels of oxidative stress as observed by the reduction of TBARS levels. Thus, we can suggest that the antioxidant properties of CGA may be one of the mechanisms whereby this polyphenol prevents alterations in the AChE activity in the diabetic condition.

It is well known that diabetes in rodents can develop behavioral changes similar to those observed in diabetic patients mainly related to learning and memory [21, 57]. In our study STZ-induced diabetic rats presented a lower latency time in the inhibitory avoidance indicating a decline in the memory (Fig 5). These results corroborate those found by [21] and suggested that alterations in the cholinergic system, as observed by the increase of AChE in our study, are directly associated with deficits in the memory in the diabetic state. In addition, DM may accelerate the brain aging process [58] and cerebral atrophy [59], which could increase the cognitive damage and lead to development of Alzheimer Disease (AD) symptoms. Alterations in insulin and glucose homeostasis may affect brain insulin and its receptor functions in the cortex cerebral and hippocampus [60] promoting increasing oligomerization of β -amyloid peptide, which is found in AD [58]. The β -amyloid plaque can be correlated with increased free radicals and lipid peroxidation [61] as well as alterations in

the cholinergic system. Rees et al. (2003) suggested that AChE can act as a factor to promote conversion of soluble amyloid peptide into insoluble amyloid fibrils. Consequently, alterations in the cholinergic system can be involved in the cognitive deficit in both pathologies Alzheimer Disease and Diabetes Mellitus.

However, when diabetic rats were treated with CGA the step-down latency in the inhibitory avoidance test was similar to that found for rats of the control group. These findings indicate that the treatment with CGA was able to prevent learning and memory impairment induced by diabetes. This effect could be associated with the prevention of the increase of the AChE activity in diabetic rats, as well as with positive effects on δ -ALA-D and Na^+ , K^+ -ATPase activities, and with a diminution of oxidative stress caused by this compound. Such effects could contribute to restore normal function in the CNS and protect neuronal cells from the changes caused by DM. In fact, AChE inhibitors make ACh more available at the cholinergic synapse increasing the action of this neurotransmitter and consequently improving the cognitive functions [63, 64]. These inhibitors may also be useful in the treatment to AD [65].

It is known that hyperglycemia causes anxiety in patients as well as in animal models of diabetes [66-68]. In this study, we observed that there is an increase in the % number of closed-arms entries, % time in closed arm as well as a decrease in the time in center and a decrease in % time in open arms in the diabetic rats. All the parameters demonstrated that the diabetic rats increased anxiety. Studies have demonstrated that the STZ-induced diabetes can change the GABAergic neurotransmission [66, 69], and this effect can be related to a decrease in the GABA levels. GABA is an inhibitory neurotransmitter in CNS and the decrease of GABA levels may lead to an increase in anxiety [70]. It is important to point out that CA and CF did not present effect in diabetic rats, but they showed an anxiogenic effect when administered in control rats. This could be linked with the effect related to the effect of CA

and CF in the antagonism of the adenosine receptors which could increase anxiety [71]. It is known that adenosine receptors are present in the GABAergic neurons in a large number and they can contribute to the control and release of this neurotransmitter. Furthermore, relative low doses of CA (20 mg/kg) appear to reduce GABA_A receptor-mediated responses leading to an increase in anxiety [72].

In addition, diabetic rats treated with CGA increased the time in center as well as decreased % time in closed arm. These results suggest a possible anxiolytic effect. CGA per se did not demonstrate effect to reduce the anxiety, however we could observe an interaction with the anxiogenic effect of DM and CGA treatment, since which CGA reduced the anxiety in the diabetic rats. Bouayed et al (2007) showed that the anti-anxiety effect of chlorogenic acid was blocked by flumazenil suggesting that this polyphenol reduced anxiety by activating the benzodiazepine receptor. This can suggest that the protector effect of the CGA is likely to be due to an action in the GABAergic system.

In conclusion, it is known that DM can alter the normal function of CNS and can also alter different enzymes and behavioral parameters. On the other hand, CGA, CA and CF have interesting effects on the brain in these tested concentrations. However, we can observe that the CGA, among the compounds studied, showed better protective effects on the change observed by diabetes. We demonstrated that these molecules may help in restoring the activity of some enzymes such as the AChE, δ -ALA-D, Na⁺, K⁺-ATPase in STZ-induced diabetic rats. However, further studies are necessary to clarify how this compound acts once it can be useful in the treatment of the disorders caused by high glucose concentration in the brain.

References

- [1] Gannon M (2001) Molecular genetic analysis of diabetes in mice. *Trends Genet.* 17: 23-28.
- [2] Ahmed N, Thornalley PJ (2007) Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes Obes Metab.* 9(3):233-45.
- [3] Gispen WH, Biessels GJ (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 23:542-9.
- [4] Schmatz R, Mazzanti C, Spanevello R. et al (2009) Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. *Brain Res Bull.* 80:371-376.
- [5] Kumar JSS, Menon VP (1993) Effect of Diabetes on Levels of Lipid Peroxides and Glycolipids in Rat Brain. *Metabolism.* 42(11):1435-1439.
- [6] Santini SA, Cotroneo P, Marra G et al (1996) Na⁺/K⁺-ATPase impairment and experimental glycation: the role of glucose autoxidation. *Free Radic. Res.* 24(5):381-9.
- [7] Pari L, Murugan P (2007) Tetrahydrocurcumin Prevents Brain Lipid Peroxidation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Med Food.* 10 (2): 323–329.
- [8] Franzon R, Chiarani F, Mendes RH et al (2005) Dietary soy prevents brain Na⁺/K⁺-ATPase reduction in streptozotocin diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 69:107–112.
- [9] Kade IJ, Nogueira CW, Rocha JBT (2009) Diphenyldiselenide and streptozotocin did not alter cerebral glutamatergic and cholinergic systems but modulate antioxidant status and sodium pump in diabetic rats. *Brain Res.* 1284:202 – 211
- [10] Sassa S (1998) ALAD porphyria, *Semin. Liver Dis.* 18: 95-101.

- [11] Rocha JBT, Saraiva RA, Garcia SC et al (2012) Aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. *Toxicol Res.* 1:85-102
- [12] Barbosa NBV, Rocha JBT, Soares JCM et al (2008) Dietary diphenyldiselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food Chem Toxicol.* 46:186–194.
- [13] Schmatz R, Belmonte L, Stefanello N, et al Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie.* 94(2):374-83.
- [14] Skou JC (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta.* 23:394-401.
- [15] Clausen T, Van Hardeveld C, Everts ME (1991) Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. *Physiol Rev.* 71:733–774.
- [16] Ver A, Csermely P, Bfnyfisz T et al (1995) Alterations in the properties and isoform ratios of brain Na^+/K^+ -ATPase in streptozotocin diabetic rats. *Biochim Biophys Acta.* 1237:143-150.
- [17] Santini AS, Cotroneo P, Marra G, et al. (1996) Na^+/K^+ -ATPase impairment and experimental glycation: the role of glucose autoxidation. *Free Radic Res.* 24:381-9.
- [18] Vague P, Coste TC, Jannot MF et al (2004) C-peptide, Na^+ , K^+ -ATPase, and Diabetes. *Experimen Diab Res.* 5:37–50.
- [19] Soreq H, Seidman S (2001) Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Neuroscience.* 2: 294-300.

- [20] Spanevello R, Mazzanti CM, Schmatz R et al (2009) Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. *Brain Res Bull.* 80:45-51.
- [21] Schmatz R, MazzantiCM, Spanevello R et al (2009). Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharm.* 610:42-48.
- [22] Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, Vinson J. (2007) Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmac Res.* 55:187-198.
- [23] Dam RM van (2006) Coffee and type diabetes: From beans to beta-cells. *Nutr Metabolism Cardiovasc Dis.* 16:69-77.
- [24] Greenberg JA, Boozer CN, Geliebter A (2006) Coffee, diabetes, and weight control. *Am J Clin Nutr* 84:682-93.
- [25] Mc Carty (2005) A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Med Hypotheses.* 64(4):848-53.
- [26] Cho AS, Jeon SM, Kim MJ et al (2010) Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol.* 48(3):937-43.
- [27] Zang L, Cosma G, Gardner H et al (2003) Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. *Mol Cell Biochem.* 247: 205-210.
- [28] Santos MD dos, Almeida MC (2006). Evaluation of the Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol Chlorogenic Acid. *Biol Pharm Bull.* 29: 2236-2240.

- [29] Sabir SM, Ahmad SD, Hamid A et al (2012) Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidagomicroglossa* containing polyphenolic compounds. *Food Chem.* 131: 741-747.
- [30] Li Y, Shi W, Li Y et al (2008). Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. *Environ Toxic Pharm* 26: 13-21.
- [31] Daly JW, Fredholm BB (2004) Mechanisms of Action of Caffeine on the Nervous System. In *Coffee, tea, chocolate and Brain*. CRC Press LLC.11:9-19.
- [32] Guerra GP, Mello CF, Sauzem PD et al. (2006) Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology*.186:150-158.
- [33] Frussa-Filho R, Barbosa-Junior H, Silva RH et al (1999) Naltrexone potentiates the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in rats exposed to novel environments. *Psychopharmacology* 147:168-73.
- [34] Rubin MA, Albach CA, Berlese DB (2000) Anxiolytic-like effects of 4-phenyl-2-trichloromethyl-3H-1, 5-benzodiazepine hydrogen sulfate in mice. *Braz J Med Biol Res.* 33:1069-73.
- [35] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95:351–358.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulphhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70-77.
- [36] Sassa S (1982) δ -Aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme.* 28 133-145.
- [37] Wyse AT, Streck EL, Barros SV et al (2000) Methylmalonate administration decreases Na^+ , K^+ -ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport*.11:2331-4.

- [38] Carvalho FB, Mello C.F, Marisco PC et al (2012) Spermidine decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. *Eur J Pharmacol.* 684:79–86.
- [39] Fiske CH, Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorous. *J Biol Chem.* 66:375-400.
- [40] Nagy A, Delgado-Escueta AV (1984) Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using non-toxic isosmotic gradient material (Percoll). *J. Neurochem.* 43:1114-1123.
- [41] Bergmeyer HU (1983) *Methods of enzymatic analysis.* Verlag Chemie, Deerfield Beach.
- [42] Ellman GL, Courtney D, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7:88-90.
- [43] Rocha JBT, Emanuelli T, Pereira ME (1993) Effects of early under nutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol Exp.* 54:431-437.
- [44] Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:218-54.
- [45] Bonnefont-Rousselot D. (2002) Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 5:561-568.
- [46] Jain SK (1988) Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 937: 205–210.
- [47] Folmer V, Soares JCM, Gabriel D, Rocha JBT (2003) A High Fat Diet Inhibits - Aminolevulinate Dehydratase and Increases Lipid Peroxidation in Mice (*Mus musculus*). *J Nutr.* 133:2165–2170.

- [48] Baynes JW, Thorpe SR (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes*.48:1–9.
- [49] Shahidi F, Chandrasekara A (2010) Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem Rev*. 9: 147–170.
- [50] Li Y, Shi W, Li Y, et al (2008) Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. *Environ Toxic Pharm*. 26:13-21.
- [51] Shi X, Dalal NS, Jain AC (1991) Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem Toxicol*. 29:1-6.
- [52] Szutowicz A, Tomaszewicz M, Bielarczyk H (1996) Disturbances of acetyl-CoA, energy and acetylcholine metabolism in some encephalopathies. *Acta Neurobiol Exp*. 56: 323-339.
- [53] Fan Y, Hu J, Li J, et al (2005) Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms. *Neurosci Lett*. 374: 222–226.
- [54] Kamalakkannan N, Prince PSM (2006) Antihyperglycaemic and Antioxidant Effect of Rutin, a Polyphenolic Flavonoid, in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 98(1):97-103.
- [55] Kuhad A, Sethi R, Chopra K (2008) Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Life Sci*. 83(3-4):128-34.
- [56] Karthikesan K, Pari L, Menon VP (2010) Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Gen Physiol Biophys*. 29: 23–30.

- [57] Biessels, GJ, Braun KPJ, Graaf R et al (2001) Cerebral metabolism in streptozotocin-diabetic rats: an in vivo magnetic resonance spectroscopy study. *Diabetology*.44:346-353.
- [58] Roriz-Filho JS, Sá-Roriz TM, Rosset I (2009) (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochim Biophys Acta*. 1792(5):432-43.
- [59] Biessels GJ, Van der Heide LP, Kamal A, Bleys RL, Gispen WH (2002) Ageing and diabetes: implications for brain function, *Eur J Pharmacol*. 441:1-14 .
- [60] Gasparini L, Xu H (2003) Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease, *Trends Neurosci*. 26:404-406.
- [61] Kaizer RR, Corrêa MC, Spanevello, RM (2005) Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *J Inorg Biochem*. 99(9):1865-70.
- [62] Rees T. et al. (2003) Acetylcholinesterase promotes beta amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiol Aging*. 24:777-787.
- [63] Das A, Dikshit M, Nath C (2005) Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions. *Pharmacol Biochem Behav*. 81(1):89-99.
- [64] Sudha S, Lakshmana MKPradhan N (1995) Changes in learning and memory, acetylcholinesterase activity and monoamines in brain after chronic carbamazepine administration in rats. *Epilepsia*. 36(4):416-22.
- [65] Grisar D, Sternfeld M, Eldor A et al (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur j Biochem*. 264:672-686.

- [66] Can OD, Oztürk Y, Ozkay UD (2011) Effects of insulin and St. John's Wort treatments on anxiety, locomotory activity, depression, and active learning parameters of streptozotocin-diabetic rats. *Planta Med.* 77(18):1970-6.
- [67] Husain GM, Chatterjee S., Singh PN, Kumar V (2011) Beneficial effect of *Hypericum perforatum* on depression and anxiety in a type 2 diabetic rat model. *Acta Pol Pharm.* 68(6):913-8.
- [68] Rajashree R, Kholkute SD, Gouda SS (2011) Effects of Duration of Diabetes on Behavioural and Cognitive Parameters in Streptozotocin-Induced Juvenile Diabetic Rats. *Malaysian J Med Sci.* 18(4): 26-31.
- [69] Gomes R, Barros HMT (2003) Clonazepam increases in vivo striatal extracellular glucose in diabetic rats after glucose overload. *Pharmacol Biochem Behav.* 76:443-450.
- [70] Antony S, Kumar TP, Kuruvilla KP et al (2010) Decreased GABA Receptor Binding in the Cerebral Cortex of Insulin Induced Hypoglycemic and Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Neurochem Res.* 35:1516-1521.
- [71] Cauli O, Morelli M (2005) Caffeine and the dopaminergic system. *Behav Pharmacol.* 16(2):63-77.
- [72] Kardos J, Blandl T (1994) Inhibition of a gamma aminobutyric acid A receptor by caffeine. *Neuroreport.* 5(10):1249-52.
- [73] Bouayed J, Rammal H, Dicko A, et al (2007). Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J Neurol Sci.* 262:77-84.

[74] Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB (1994) STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. 43:1326-1333.

[75] Fujioka K, Shibamoto T (2008) Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chem*. 106:217-22.

Table 1. Body weight of STZ-induced diabetic rats and treated with chlorogenic acid, caffeine and coffee. n=10.

Groups	Beginning of treatment (g)	End of treatment (g)
Control	295.8±4.15	312.8±3.68
Chlorogenic acid (CGA)	284.3±5.76	305.0± 5.72
Caffeine (CA)	312.7±8.16	326.6± 9.7
Coffee	299.1±6.48	311.5±8.05
Diabetic Control	240.0±9.09*	207.12±7.45*
Diabetic + CGA	238.9±11.49*	221.0±11.40*
Diabetic + CA	243.8±12.7*	210.0±12.01*
Diabetic + Coffee	238.8±7.03*	200.1±11.44*

* indicates a significant difference in relation to the control group, at P< 0.05, n=10.

Table 2. Effects of the treatments with chlorogenic Acid (CGA), caffeine (CA) and Coffee on STZ-induced increase in plasma glucose levels (n=10).

Groups	Glucose(mg/dL)
Control	151.8±12.99
Chlorogenic acid (CGA)	131.5 ± 8.84
Caffeine (CA)	138.6 ± 18.33
Coffee	125.8 ± 13.62
DiabeticControl	396.8 ± 6.98*
Diabetic + CGA	345.8 ± 55.24*
Diabetic + CA	423.3± 24.16*
Diabetic + Coffee	427.8± 25.02*

* indicates a significant difference in relation to the control group, at P< 0.05, n=10.

Legends

Figure 1

TBARS levels in cerebral cortex from STZ-induced diabetic rats and those treated with water, chlorogenic acid, caffeine and coffee. Bars represent means±SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control

group, at $P < 0.05$, $n=5$. # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group, at $P < 0.05$, $n=5$.

Figure 2

δ -ALA-D activity in cerebral cortex from STZ-induced diabetic rats and those treated with water, chlorogenic acid, caffeine and coffee. Bars represent means \pm SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group, at $P < 0.05$, $n=5$.

Figure 3

Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex from STZ-induced diabetic rats and those treated with water, chlorogenic acid, caffeine and coffee. Bars represent means \pm SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group, at $P < 0.05$, $n=8-10$.

Figure 4

AChE activity in synaptosomes of cortex cerebral from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means \pm SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test.* indicates a significant difference in relation to the control group, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group, at $P < 0.05$, $n=8-10$.

Figure 5

Effects of chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) on memory test in the inhibitory avoidance from STZ-induced diabetic rats. Time of descent of the platform is demonstrated by median \pm interquartile. * indicates a significant difference in relation to the other groups, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group and • indicates values similar to diabetic and control group ($P < 0.05$) $n = 8-11$.

Figure 6

Effects of chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) on anxiolytic-like behavior test in the elevated plus-maze from STZ-induced diabetic rats. Graph 6A represents the % number of closed arm entries, at $P < 0.05$. Graph 6B represents the % time in the closed arms, at $P < 0.01$. Graph 6C represents the time in center. Graph 6D shows % time in open arm. Graph 6E represents the total number of entries. Data are reported as means \pm SEM. Two-way ANOVA was used * indicates a significant difference in relation to the control group, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group and • indicates values similar to diabetic and control group, at $P < 0.05$, $n = 8-10$.

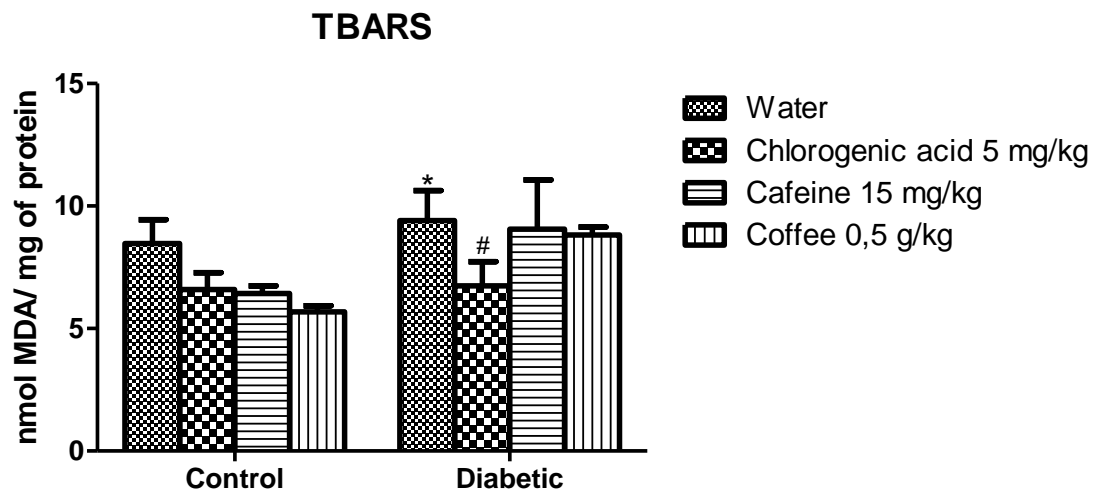


Figure 1

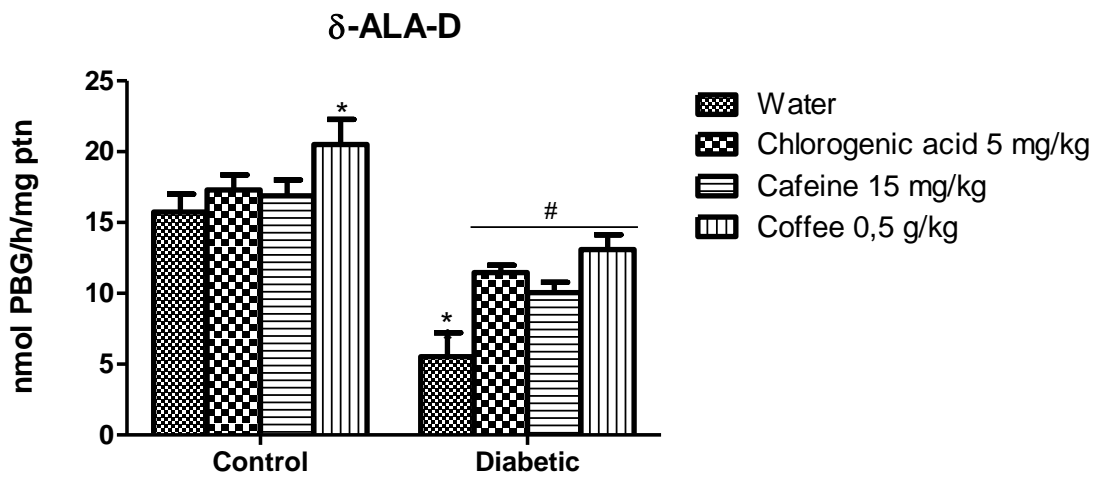


Figure 2

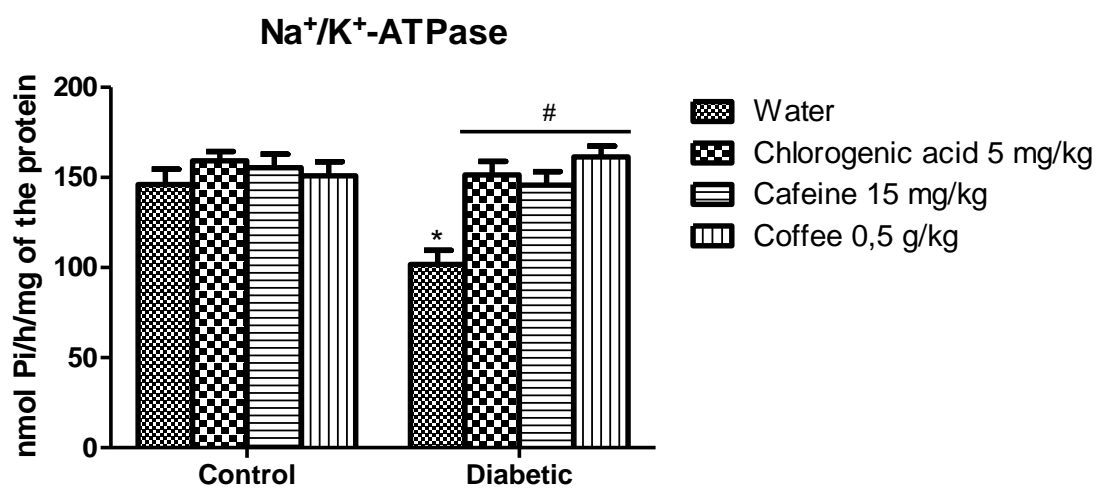


Figure 3

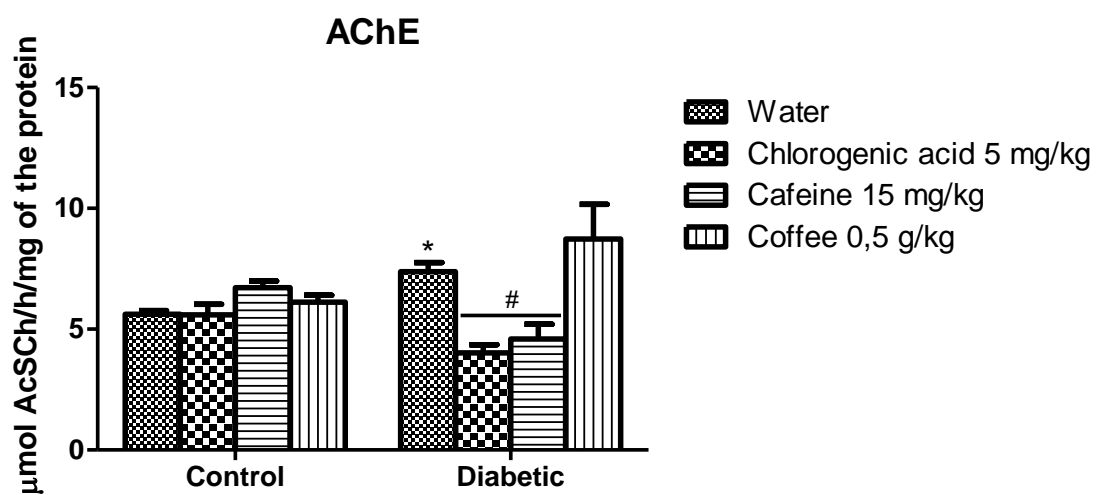


Figure 4

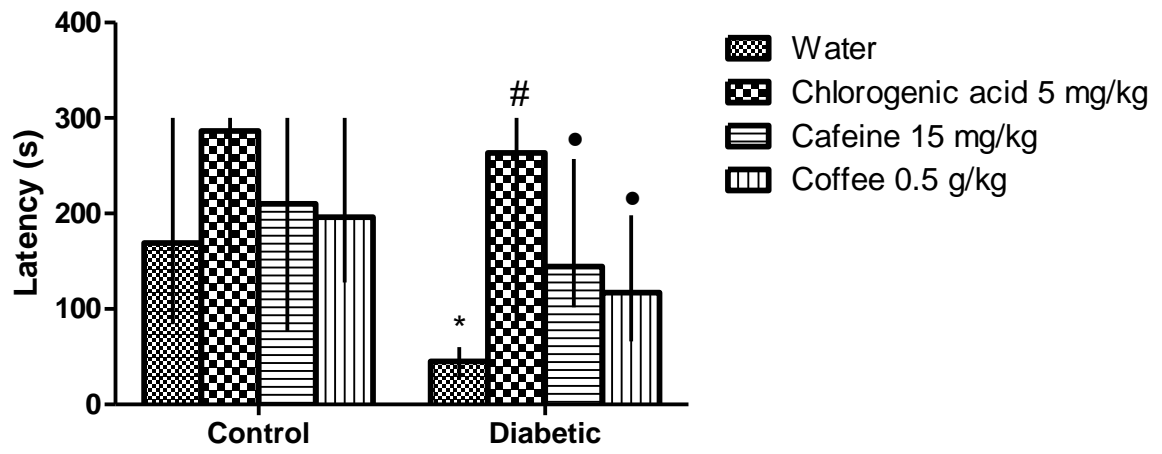


Figure 5

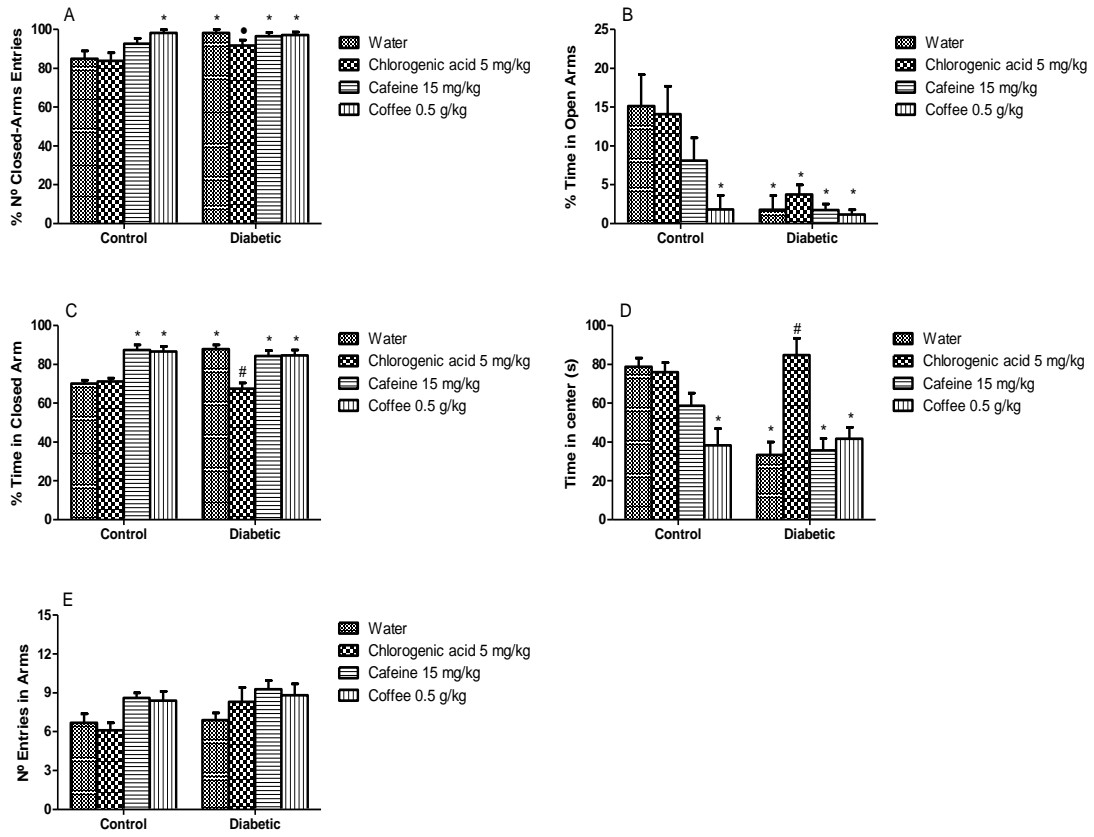


Figure 6

4.CONCLUSÕES

- O DM aumentou os níveis de TBARS no córtex cerebral. Esse efeito pode estar relacionado ao aumento do estresse oxidativo no cérebro, um órgão bastante suscetível a radicais livres, bem como a alta composição lipídica desse órgão. Apenas o tratamento com ácido clorogênico foi eficaz para reduzir o aumento nos níveis de TBARS. Este efeito pode ser devido à capacidade antioxidante do ácido clorogênico.
- Uma diminuição na atividade da enzima δ -ALA-D foi observado nos ratos diabéticos, a qual pode estar relacionada à glicação não enzimática de grupos SH nas proteínas devido ao aumento no estresse oxidativo. Os tratamentos com ácido clorogênico, cafeína e café restauraram parcialmente a atividade dessa enzima nos ratos diabéticos quando comparado com o grupo diabético sem tratamento. Esse efeito também pode estar relacionado com as propriedades antioxidantes do ácido clorogênico e cafeína.
- Uma diminuição na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase foi observada nos ratos diabéticos. Isto pode estar associada com um aumento no estresse oxidativo e/ou uma desestabilização da membrana plasmática. O tratamento com todos os compostos restaurou parcialmente a inibição dessa enzima.
- A atividade da AChE apresentou um aumento nos ratos diabéticos, o qual pode estar associado com uma maior liberação do neurotransmissor ACh. O tratamento com ácido clorogênico promoveu uma diminuição na atividade da AChE, podendo levar a uma melhora na homeostase cerebral devido a proteção nos outros parâmetros estudados. A cafeína também provocou uma diminuição na atividade da AChE em ratos diabéticos. Esse efeito pode estar relacionado à atuação desse alcalóide como um antagonista dos receptores de adenosina, influenciando na neurotransmissão colinérgica.
- Um decréscimo na memória foi observado em ratos diabéticos induzidos por STZ. Esses efeitos podem estar relacionadas às alterações observadas no sistema colinérgico que é descrito por estar relacionada à formação da memória no córtex cerebral. Além disso, somente o ACG reverteu os danos induzidos pela hiperglicemia na piora da

memória. Esse efeito pode estar ligado aos outros efeitos positivos demonstrado por esse composto no SNC.

- Ratos diabéticos induzidos por STZ também apresentaram um aumento na ansiedade, o qual pode estar ligado a alterações no sistema colinérgico e GABAérgico no córtex cerebral. O ACG vem sendo descrito como um composto que pode reduzir a ansiedade por atuar nos receptores gabaérgicos. Esse efeito foi observado em ratos diabéticos induzidos por STZ e tratados com ACG. Além disso, a CA e o CF demonstraram efeito ansiogênico *per se* em ratos controles. Essas alterações já são descritas na literatura com efeitos relacionados à cafeína e sua ação como antagonista dos receptores de adenosina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 11, p. 180-187, 2001.

ABREU-VILLAC, Y.; FILGUEIRAS, C. C.; MANHÃES, A. C. Developmental aspects of the cholinergic system. **Behavioural Brain Research**. v. 221, n. 2, p. 367-378, 2011.

ACQUAS, E.; WILSON, C.; FIBIGER, H.C. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. **Journal of Neuroscience**. v. 16, p. 3089-96, 1996.

ALBRIGHT, T. D.; KANDEL, E. R.; POSNER, M. I. Cognitive neuroscience. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 10, p. 612-624, 2000.

ALDUNATE, R. et al. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain Research Reviews**. v. 47, p. 96-104, 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, p. 64-71, 2012.

ANTONY, S. et al., Decreased GABA Receptor Binding in the Cerebral Cortex of Insulin Induced Hypoglycemic and Streptozotocin Induced Diabetic Rats. **Neurochemical Research**. v. 35, p. 1516-1521, 2010.

ASPLUND, K. et al. Partial protection against STZ-induced hyperglycaemia by superoxide dismutase linked to polyethylene glycol. **Acta Endocrinology**. v. 107, p. 390-4, 1984.

BARATTI, C.M.; OPEZZO, J.W.; KOPF, S.R. Facilitation of memory storage by the acetylcholine M2 muscarinic receptor antagonist AF-DX 116. **Behavioral Neural Biology**. v. 60, p. 69-74, 1993.

BARBOSA, N.B.V. et al. Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.149, p. 243-253, 1998.

BASSOLI, B. et al. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. **Cell Biochemistry and Function**. v. 26, p. 320-328, 2008.

BECHARA, E.J. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 29 p. 841-851, 1996.

BECKER, D.; VILJOEN, D.; KRAMER, S. The inhibition of red cell and brain ATPase by δ -aminolaevulinic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 225, n. 1, p. 26-34, 1971.

BÉGUIN et al. The gamma subunit is a specific component of the Na⁺, K⁺-ATPase and modulates its transport functions. **EMBO Journal**. v.14, n. 16, p.4250-4260, 1997.

BELLUSH, L.L.; REID, S.G: Altered behaviour and neurochemistry during short term insulin withdrawal in streptozocin induced diabetic rats. **Diabetes**. v. 40, p.217-222, 1991.

BERNSTON, G. G.; SARTER, M.; CACIOPPO, J. T. Anxiety and cardiovascular reactivity: the basal forebrain cholinergic link. **Behavior Brain Research**. v. 94, p. 225-48, 1998.

BIESSELS, G. J. Caffeine, diabetes, cognition, and dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 20, p. 143-50, 2010.

BLANCO, E. et al. Effects of medial prefrontal cortex lesions on anxiety-like behaviour in restrained and non-restrained rats. **Behavior Brain Research**. v. 201, p. 338-42, 2009.

BONDY, C.A.; CHENG, C.M. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. **European Journal of Pharmacology**. v. 490, p. 25-31, 2004.

BONITA, J. S. et al. Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies. **Pharmacological Research**. v. 55, p. 187-198, 2007.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. et al. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. **Diabetes & Metabolism**. v. 26, p. 163-176, 2000.

BARONE, J.J.; ROBERTS, H. Human consumption of caffeine. In:_____ DEWS, P.B. Caffeine: Perspectives from recent research. Berlin: Springer- Verlag, 1984. seção II, cap. 4, p. 59-73.

BOUAYED, J. et al. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 262, p.77-84, 2007.

BRENNAN, M.J.; CANTRILL, R.C. Delta-Aminolaevulinic acid and amino acid neurotransmitters. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.11, n.38, p. 49-58, 1981.

BREZIS, M.; ROSEN, S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. **New England Journal of Medicine**. v. 332, p. 647-655, 1995.

BRODMANN, K. Beitrage zur histologischen lokalisation der grosshirnrinde. VI. Mitteilung: die cortexgliederung des menschen. **Journal für Psychologie und Neurologie**. v.10, p. 231-246, 1908.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. v. 414, p. 813-820, 2001.

BYMASTER, F.P. et al. Comparative behavioral and neurochemical activities of cholinergic antagonists in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 267, p. 16-24, 1993.

BYSTRON, I.; BLAKEMORE, C.; RAKIC, P. Development of the human cerebral cortex. **Boulder Committee revisited**, v.9, p. 1-122, 2008.

CABALLERO, F.A. et al. Alteraciones en el camino metabólico del hemo en pacientes diabéticos. **Medicina**. v.55, p. 117-124, 1995.

CAMPOS, A.C. Efeito do Canabidiol injetado na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos submetidos a dois modelos de ansiedade. 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Ribeirão Preto, 2008.

CARRILLO, J.A.; BENITEZ, J. Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 39, p. 127-153, 2000.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In:_____. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. cap. 16, p. 403-434.

CHENG, J.T.; CHI, T.C.; LIU, I.M. Activation of adenosine A1 receptors by drugs to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. **Autonomic Neuroscience**. v. 83, n. 3, p. 127-33, 2000.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 79, p. 362-372, 1999.

CONVIT, A. et al. Reduced glucose tolerance is associated with poor memory performance and hippocampal atrophy among normal elderly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 100, n. 4, p. 2019-22, 2003.

CORNELIUS, F. Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of exchange reactions performed by reconstituted Na/K-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1071, n.1, p.19-66, 1991.

CREWS, H.M.; OLIVIER, L.; WILSON, L.A. Urinary biomarkers for assessing dietary exposure to caffeine. **Food Additives and Contaminants**. v. 18, p. 1075-1087, 2001.

DALY, J. W.; FREDHOLM, B.B. Mechanisms of Action of Caffeine on the Nervous System. In:_____.Coffee, Tea, Chocolate and Brain. 1. ed. Florida: Editora CRC Press LLC, 2004. cap. 1, p. 9-19.

DALY, J.W. Mechanism of action of caffeine. In: Garattini S, ed. Caffeine, coffee and health. New York, NY: Raven Press, Ltd, 1993:97-150.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**. v. 13, p. 214-221, 2007.

DENT, A. et al. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinatr dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. **Biochemistry**. v. 29, p. 7822-7828, 1990.

DU, X. L. et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 97, p. 12222-26, 2000.

EAKLE, K. A. et al. The influence of beta subunit structure on the stability of Na⁺, K⁺-ATPase complexes and interaction with K⁺. **Journal of Biological Chemistry**. v. 269, p. 6550-6557, 1994.

EDELMAN et al. Utility of hemoglobin A1c in predicting diabetes risk. **Journal of General Internal Medicine**. v. 19, n. 12, p.1175-80, 2004.

ERECINSKA, M.; SILVER, I.A. ATP and brain function. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v.9, p. 2-19, 1989.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FOLMER, V. et al. A High Fat Diet Inhibits δ -Aminolevulinatase Dehydratase and Increases Lipid Peroxidation in Mice (*Mus musculus*). **Journal of Nutrition**. v.133, p. 2165-2170, 2003.

FOLMER, V.; SOARES, J.C.M.; ROCHA, J.B.T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 34, p.1279-1285, 2002.

FOWLER, M.J. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. **Clinical Diabetes**. v. 26, n. 2, p. 77-82, 2008.

GANNON, M. Molecular genetic analysis of diabetes in mice. **TRENDS in Genetics**. v. 17, N. 10, p. 23-28, 2001.

GIBBS, K.D.; JORDAN, P.M. Identification of lysine at the site of human δ -aminolevulinatase dehydratase. **Biochemical Journal**. v. 236, p.447-451, 1986.

GIBSON, K.D.; NEUBERGUER, A.; SCOTT, J.J. The purification and proprieties of δ -aminolaevulinic acid dehydratase. **Biochemical Journal**. v. 61, n.4, p.618-29, 1955.

GILBERT, R.M. et al. Caffeine content of beverage as consumed. **Canadian Medical Association Journal**. v. 114, p. 205-2013, 1976.

GOMES, R.; BARROS, H.M.T Clonazepam increases in vivo striatal extracellular glucose in diabetic rats after glucose overload. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 76, p. 443-450, 2003.

GOODWIN, MERCER, E. I. Introduction to plant biochemistry. Oxford:Pergamon, 1975.

GRAEFF, F. G. et al. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**. v. 23, p. 237-246, 1998.

GREENBERG, J. A.; BOOZER, C. N.; GELIEBTER, A. Coffee, diabetes, and weight control. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 84, p. 682-93, 2006.

GRISARU, D. et al. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **European Journal of Biochemistry**. v. 264, p.672-686, 1999.

GUYOT, L.L . et al., The effect of streptozotocin-induced diabetes on the release of excitotoxic and other amino acids from the ischemic rat cerebral cortex. **Neurosurgery**. v. 48, p. 385-91, 2001.

HASSELMO, M. E. Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. **Behavior Brain Research**. v. 67, p. 1-27, 1995.

HENRIQUES, A.T. Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos. In:_____. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. cap. 16, p. 403-434.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.46, p.101-123. 2006.

HUSAIN, G.M. et al. Beneficial effect of Hypericum perforatum on depression and anxiety in a type 2 diabetic rat model. **Acta Poloniae Pharmaceutica**. v. 68, n. 6, p. 913-8, 2011.

IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**. v. 393, p. 635-636, 1998.

IZQUIERDO, I. Memória. Artmed Editora S.A. 2002.

JAFFE, E.K.; MARKHAM, G. D.; RAJAGOPALAN, J.S. ¹⁵N and ¹³C NMR studies of ligands bound to the 280000-dalton protein porphobilinogen synthase elucidate the structures of enzyme-bound product and a Schiff base intermediate. **Biochemistry**. v. 29, p. 8345-8350, 1990.

JAKUS, V. The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. **Bratislava Medical Journal**. v. 101, n. 10, p. 541-551, 2000.

JOHNSON G. et al. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 258, p. 758-762, 1999.

JOHNSON-KOZLOW, M. et al. Coffee Consumption and Cognitive Function among Older Adults. **American Journal of Epidemiology**. v. 156, n. 9, p. 842-850, 2002.

JOHNSTON, K.; CLIFFORD, M.; MORGAN, L. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **American Journal of Clinical Nutrition** v. 78, p. 728-733, 2003.

JORGENSEN, P. L.; HAKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annual Review of Physiology**. v. 65, p. 817-849, 2003.

KADE, I.J.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and streptozotocin did not alter cerebral glutamatergic and cholinergic systems but modulate antioxidant status and sodium pump in diabetic rats. **Brain Research**. v. 1284, p. 202-211, 2009.

KAWAKAMI, K.; NAGANO, K. The transmembrane segment of the human Na,K-ATPase beta-subunit acts as the membrane incorporation signal. **Journal of Biochemistry**. v. 103, p. 54-60, 1988.

KAWASHIMA K. et al. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Science**. v.74, p. 675-696, 2003.

KONO, B. et al. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 62, p. 22-27, 1998.

KRAKUER, T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. **Immunopharmacology Immunotoxicology**. v. 24, p. 113-119, 2002.

KRUL, C.; HAGEMAN, G. Analysis of urinary caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**. v. 709, p. 27-37, 1998.

KUMAR, J.S.S.; MENON, V. P. Effect of Diabetes on Levels of Lipid Peroxides and Glycolipids in Rat Brain. **Metabolism**. v. 42, n. 11, p. 1435-1439, 1993.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochemical Reviews**. v. 7, p. 301-311, 2008.

LEES, G. V.; JONES, E. G. Expressive Genes Record Memories. **Neurobiology of Disease**. v. 7, p. 533-536, 2000.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de neurociência. Editora Atheneu, São Paulo, 2004.

LEVIN, B.E.; DUNN-MEYNELL, A.A. Effect of streptozotocin-induced diabetes on rat brain sulfonylurea binding sites. **Brain Research Bulletin**. v.46, p. 513-8, 1998.

LIEBERMAN, L.S. dietary, evolutionary, and modernizing Influences on the prevalence of type 2 Diabetes. **Annual Review of Nutrition**. v. 23, p. 345-77, 2003.

LOWNDES, J.M.; HOKIN-NEAVERSON, M.; RUOHO, A.E. Photoaffinity labeling of (Na+K+)-ATPase with [125I]iodoazidocymarin. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-275, 1984.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 79, p. 727-47, 2004.

MARTIN, D.L.; TOBIN, A.J. Mechanisms controlling GABA synthesis and degradation in the brain. In: Martin DL, Olsen RW, editors. GABA in the nervous system: the view at fifty years. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 25-41.

MASIELLO, P., et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. **Diabetes**. v.47, p.224-229, 1998.

MASSOULIE, J. et al. Old and new questions about cholinesterases. **Chemico-Biological Interactions**. v. 175, p. 30-44, 2008.

MCCALL, A.L.; MILLINGTON, W.R.; WURTMAN, R.J. Metabolic fuel and aminoacid transport into the brain in experimental diabetes mellitus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 79, p.5406-5410, 1982.

MCGAUGH, J. L. Memory- a Century of Consolidation. **Science**. v. 287, p. 248-251, 2000.

MCLOUGHLIN, J.L.; CANTRILL, R.C. The effect of delta-aminolaevulinic acid on the high affinity uptake of aspartic acid by rat brain synaptosomes. **General Pharmacology**. v. 15, n.6, p.553-5, 1984.

MILLAN M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**. v. 70, p. 83-244, 2003.

MÜLLER, W.E.; SNYDER, S.H. delta-Aminolevulinic acid: influences on synaptic GABA receptor binding may explain CNS symptoms of porphyria. **Annals Neurology**. v. 2, n. 4, p.340-2, 1977.

MURUNGAN, P.; PARI, L. Antioxidant effect of tetrahydrocurcumin in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **Life Science**. v.79, p. 1720-1728, 2006.

NABESHIMA, T. Behavioral aspects of cholinergic transmission: role of basal forebrain cholinergic system in learning and memory. **Progress in Brain Research**. v. 98, p. 405, 1993.

OHNO, M.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, S. Blockade of hippocampal M1 muscarinic receptors impairs working memory performance of rats. **Brain Research**. v. 650, p. 260-66, 1994.

OLTHOF, M. R. et al. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **Journal of Nutrition**. v. 133, p. 1806-1814, 2003.

PALTRONIERI, S.C. Avaliação da administração de drogas serotoninérgicas intra-hipotálamo-ventromedial nas respostas comportamentais de defesa obtidas em dois modelos animais de ansiedade. 2007. 95 f. Tese (Doutorado em Psicobiologia). Ribeirão Preto, 2007.

PRATT, J. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacological Therapeutics**. v. 55, p. 149-181, 1992.

RAJASHREE, R.; KHOLKUTE, S.D.; GOUDAR, S.S. Effects of Duration of Diabetes on Behavioural and Cognitive Parameters in Streptozotocin-Induced Juvenile Diabetic Rats. **Malaysian Journal of Medical Sciences**. v. 18, n.4, p. 26-31, 2011.

RANG, H.P. et al., Aminoácidos transmissores. In_____.Farmacologia. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. cap. 33, p. 479-491.

RATES, S. M. K. Metilxantinas. In:_____. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. cap. 16, p. 403-434.

REES, T. et al. Acetylcholinesterase promotes beta amyloid plaques in cerebral cortex.**Neurobiology Aging**. v. 24, p. 777-787, 2003.

RUBIN, M.A. et al. Anxiolytic-like effects of 4-phenyl-2-trichloromethyl-3H-1,5-benzodiazepine hydrogen sulfate in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, p. 1069-1073, 2000.

RUSSELL, V.A.; LAMM, M.C.; TALJAARD, J.J. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity by delta-aminolevulinic acid. **Neurochemical Research**. v. 8, n.11, p.1407-15, 1983.

SAHAKIAN, B.J.; COULL, J.T. Nicotine and tetrahydroaminoacridine: evidence for improved attention in patients with dementia of the Alzheimer type. **Drug Development Research**. v. 31, p. 80-88, 1994.

SANTINI, S.A et al. Na⁺/K⁺-ATPase impairment and experimental glycation: the role of glucose autoxidation. **Free Radical Research**. v. 24, n. 5, p. 381-9, 1996.

SANTOS, M. et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 29, p.2236-2240, 2006.

SANTOS, R. I. dos Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In:_____. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. cap. 16, p. 403-434.

SAVAKI, H. et al. Activity-dependent energy metabolism in rat posterior pituitary primarily reflect sodium pump activity. **Journal of Neurochemistry**. v.34, p. 213-215, 1980.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie**. v.94, n.2, p.374-83, 2012.

SCHNEDL, W.J., et al. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes**. v. 43, p.1326-1333, 1994.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 5, p. 293-302, 2005.

SIMA, A. A.; SUGIMOTO, K. Experimental diabetic neuropathy: An update. **Diabetologia**. v. 42, p. 773-788, 1999.

SIMA, A.A.; KAMIYA, H.; LI, Z.G. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. **European Journal of Pharmacology**. v. 490, p. 187-197, 2004.

SKOU, J.C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 23, n. 2, p.394-401, 1957.

SOREQ, H. SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Neuroscience**. v. 2, p. 294-300, 2001.

SOTILLO, R. D.; HADLEY, M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 13, p. 717-726, 2002.

STERNFELD, M. et al. Excess “read-through” acetylcholinesterase attenuates but the “synaptic” variant intensifies neurodeterioration correlates. **Neurobiology**. v. 97, p. 8647-8652, 2000.

STRECK, E.L. et al. Inhibition of Rat Brain Na⁺, K⁺-ATPase Activity Induced by Homocysteine Is Probably Mediated by Oxidative Stress. **Neurochemical Research**. v. 26, n. 11, p. 1195-1200, 2001.

SULLIVAN, R. M.; GRATTON, A. Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. **Brain Research**. v. 927, p. 69-79, 2002.

SWEENEY, G.; KLIP, A. Regulation of the Na⁺ /K⁺ -ATPase by insulin: Why and how? **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 182, p. 121-133, 1998.

SZUTOWICZ, A.; TOMASZEWICZ, M.; BIELARCZYK, H. Disturbances of acetyl-CoA, energy and acetylcholine metabolism in some encephalopathies. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**. v. 56, p. 323-339, 1996.

TAKAMA, Y. et al. Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozotocin. **Pharmacology**. v. 50, p. 69-73, 1995.

THERIEN, A. G. et al Tissue-specific distribution and modulatory role of the gamma subunit of the Na,K-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 32628-32634, 1997.

THOM, E. The Effect of Chlorogenic Acid Enriched Coffee on Glucose Absorption in Healthy Volunteers and Its Effect on Body Mass When Used Long-term in Overweight and Obese People. **Journal of International Medical Research**. v. 35, p. 900-908, 2007.

THOMAS, R.C. Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. **Physiological Reviews**. v. 52, n.3, p.563-94, 1972.

TIMBRELL, J.A. Principles of biochemical Toxicology. 2nd Ed, London: Taylor & Francis, pp.180, 1991.

TREVISAN, R.; VEDOVATO, M.; TIENGO, A. The epidemiology of diabetes mellitus. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 13, p. 1-5, 1998.

TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochemical and Biophysical Acta**. v. 570, p.167-178, 1979.

UCCIOLI L. et al. Abnormal agonist stimulated cardiac parasympathetic acetylcholine release in streptozotocin diabetes. **Diabetes**. v. 42, p.141-147, 1993.

VAGUE, P. et al. C-peptide, Na⁺, K⁺ -ATPase, and Diabetes. **Experimental Diabetes Research**. v. 5, p. 37-50, 2004.

Van DAM, R.M. Coffee and type 2 diabetes: From beans to beta-cells. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**. v. 16, p. 69-77, 2006.

VARANI, K. et al. Receptors : Functional and Biochemical Aspects Dose and Time Effects of Caffeine Intake on Human Platelet Adenosine A2A. **Circulation**. v. 102, p. 285-289, 2000.

VER, A. et al. Alterations in the properties and isoform ratios of brain Na⁺/K⁺ +-ATPase in streptozotocin diabetic rats. **Biochemical et Biophysical Acta**. v.1237, .143-150, 1995.

WAHBA, Z.Z.; SOLIMAN, K.F.A. Effect of diabetes on the enzymes of the cholinergic system in the rat brain. **Experientia**. v. 44, p.742-746, 1988.

WAHBA, Z.Z.; SOLIMAN, K.F.A.; KOLTA, M.G. Effect of diabetes on cholinergic enzyme activities of the urinary bladder and the seminal vesicles of the rat. **Experimental and Clinical Endocrinology**. v. 98, p. 26-30, 1992.

WALL, P. M.; FLINN, J.; MESSIER, C. Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous working memory in mice. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 155, p. 58-68, 2001.

WALL, P. M.; MESSIER, C. Infralimbic kappa opioid and muscarinic M1 receptor interactions in the concurrent modulation of anxiety and memory. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 160, p. 233-44, 2002.

WERNER H. et al. Regulation of rat brainHepG2 glucose transporter gene expression by insulin and insulin-like growth factor I in primary cultures of neuronal and glial cells. **Endocrinology**. v. 125, p. 314-320, 1989.

World Health Organization (WHO). Disponível em http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_joomlabook&Itemid=259&task=display&id=220, acessado em 18 de Julho de 2012.

ZHAO, W.; ALKON, D.L. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 177, p. 125-134, 2001.