

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

**EFEITO DO EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE NA
ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA
PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM RATOS
TRATADOS COM CAFEÍNA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliano Marchi Vieira

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**EFEITO DO EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE NA
ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO E
COLINÉRGICO EM RATOS TRATADOS COM CAFEÍNA**

Juliano Marchi Vieira

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

Orientadora: Prof. Dra. Rosélia Maria Spanevello

Santa Maria, RS, Brasil

2012

A _____Vieira, Juliano Marchi

Efeito de um protocolo de exercício intermitente de alta intensidade na atividade de enzimas do sistema purinérgico e colinérgico em ratos tratados com cafeína / por

Juliano Marchi Vieira - 2012

___ f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Rosélia Maria Spanevello

Coorientador: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2012

1. Exercício Físico de alta intensidade 2. Cafeína 3. Sistema Purinérgico 4. Sistema Colinérgico

I. Spanevello, Rosélia Maria II. Schetinger, Maria Rosa Chitolina

III. Título.

CDU 577.1

Ficha catalográfica elaborada
Biblioteca Central da UFSM

© 2012

Todos os direitos autorais reservados a Juliano Marchi Vieira. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Alameda Sibipiruna, n.500, Cerrito, Santa Maria, RS. CEP: 97095-660

Fone: 55 99844188; E-mail: jucefd@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica
EFEITO DO EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE NA ATIVIDADE DE ENZIMAS
DO SISTEMA PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM RATOS TRATADOS COM
CAFEÍNA**

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

elaborada por
Juliano Marchi Vieira

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Rosélia Maria Spanevello, Dr^a (Presidente/ Orientadora)

Nilda Berenice de Vargas Barbosa, Dr^a (1^o membro da banca)

Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti, Dr^a (2^o membro da banca)

Santa Maria, 11 de junho de 2012

*Dedico este trabalho a minha família.
Os quais torceram, vibraram e sofreram comigo.
Obrigado, João B.M. Vieira e Bernadete Marchi Vieira,
pela base e ensinamentos que me foram proporcionados.
Obrigado, Gisele Marchi Vieira minha irmã, pelo apoio incondicional
nas situações mais difíceis.
Obrigado aos meus sobrinhos Bruno e Bibiane por me mostrarem que a
vida não é feita apenas trabalho é também riso, brincadeiras e alegria.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai João, por todo amor e dedicação que sempre teve comigo, homem pelo qual tenho maior orgulho de chamar de pai, meu eterno agradecimento pelos momentos em que estive ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível. Um homem batalhador, que abriu mão de muitas coisas para me proporcionar a realização deste trabalho;

A minha mãe Bernadete, por ser tão dedicada e amiga, por ser a pessoa que mais acredita na minha capacidade, meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo;

A minha irmã Gisele pelo carinho e atenção que sempre tive comigo, sempre me apoiando no momentos mais difíceis, enfim por todos os conselhos e pela confiança em mim depositada meu imenso agradecimento;

A Luciane Belmonte, uma pessoa que admiro muito que deu forças e esteve sempre ao meu lado não importando a hora. Obrigado Lu, pelo teu carinho e companheirismo.

Aos amigos que fiz no Enzitox, pela verdadeira amizade que construímos, pelo companheirismo durante horas e horas em frente à bancada. Em particular aqueles que estavam sempre ao meu lado (Jessié, Marília, Fabiano) por todos os momentos que passamos durante esses anos meu especial agradecimento. Sem vocês essa trajetória não seria tão prazerosa;

A minha querida amiga e orientadora, professora Róselia Maria Spanevello, pelos ensinamentos e dedicação dispensados no auxílio à concretização deste trabalho.

As professoras Maria Rosa Chitolina Shetinger e Vera Morsch, pela paciência, dedicação e ensinamentos disponibilizados nas aulas;

À UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTox), pela oportunidade;

À CAPES, pela bolsa concedida.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos (Sandro Alves e Maristela Souza Muniz) pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva, o meu eterno AGRADECIMENTO.

.

“Dare To Dream”
Tom Platz

RESUMO

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

EFEITO DO EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM RATOS TRATADOS COM CAFEÍNA

Autor: Juliano Marchi Vieira
Orientadora: Roselia Maria Spanevello
Co-orientadora: Maria Rosa Chitolina Schentiger
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 11 de junho de 2012.

O exercício físico de alta intensidade produz benefícios fisiológicos, cognitivos e neurais. A cafeína tem sido considerada um recurso ergogênico associada ao exercício, devido a sua capacidade de bloquear os receptores de adenosina. Devido ao fato dos mecanismos relacionados ao efeito da cafeína no exercício físico ainda não serem totalmente elucidados, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da cafeína *per se* ou em associação ao exercício de alta intensidade na atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosina desaminase (ADA) e acetilcolinesterase (AChE) em encéfalo de ratos. Os animais foram divididos em seis grupos: I (controle/sedentário); II (sedentário tratado com cafeína 4mg/kg); III (sedentário tratado com cafeína 8mg/kg); IV (treinado); V (treinado e tratado com cafeína 4mg/kg) e VI (treinado e tratado com cafeína 8mg/kg). A natação com adição de sobrecarga ao dorso de ratos foi utilizada como modelo de exercício sendo que os ratos foram treinados 3 vezes por semana com aumentos progressivos (2,5% do peso corporal) a cada semana até 23% do peso corporal. Cafeína foi administrada durante cinco dias na semana por gavagem uma hora antes do exercício. Os ratos foram submetidos ao tratamento com cafeína associado ao protocolo de exercício durante seis semanas. Os resultados demonstraram que não houve alterações na hidrólise do ATP (10,14%), ADP (23,2%) e AMP (45,89%) bem como na atividade da ADA (27,33%) em sinaptossomas de córtex cerebral do grupo treinado (IV). Quando ratos treinados foram tratados com cafeína ocorreu um aumento na hidrólise do ADP, AMP e na atividade da ADA em sinaptossomas de córtex cerebral (grupos V e VI) ($P < 0.05$). Em relação a AChE, uma diminuição aproximada de 40% na atividade dessa enzima ocorreu em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos treinados e/ou tratados com cafeína (grupo IV, V e VI) ($P < 0.05$). O exercício *per se* não alterou a atividade da AChE em homogeneizado de córtex cerebral, estriado, cerebelo e hipocampo (grupo IV). Nos ratos do grupo V foi observado uma diminuição na atividade da AChE em hipocampo e um aumento em estriado e córtex cerebral ($P < 0.05$) enquanto que nos animais do grupo VI ocorreu um aumento na atividade da AChE em córtex cerebral e cerebelo quando comparado com outros grupos ($P < 0.05$). Esses resultados sugerem que a cafeína *per se* ou associada ao exercício de alta intensidade modula a sinalização purinérgica e colinérgica em ratos.

Palavras-chave: Exercício físico de alta intensidade, cafeína, sistema purinérgico, sistema colinérgico.

ABSTRACT

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

EFFECT OF HIGH INTENSITY PHYSICAL TRAINING IN ACTIVITY OF ENZYMES PURINERGIC AND CHOLINERGIC SYSTEM IN RATS TREATED WITH CAFFEINE

Author: Juliano Marchi Vieira
Advisor: Rosélia Maria Spanevello
Co-advisor: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Place and Date: Santa Maria, June 11, 2012.

The high intensity exercise produces physiological, neural and cognitive benefits. Caffeine has been considered an important ergogenic resource in exercise, due to its ability to block adenosine receptors. Due to fact the mechanisms related to effect of caffeine on physical exercise has not yet been fully elucidated, in this study we evaluated the effects of caffeine treatment alone or in association with high intensity exercise on the enzymes NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosine deaminase (ADA) and acetylcholinesterase (AChE) in brain of rats. Animals were divided into six groups: I - (Control untrained); II - (untrained plus caffeine 4 mg/kg); III - (untrained plus caffeine 8 mg/kg); IV- (only trained) V- (trained plus caffeine 4 mg/kg) and VI - (trained plus caffeine 8 mg/kg). Swimming was used as a model of intermittent exercise. Animals were trained three times a week, gradually increasing the workload up to 2.5% of the animal's body weight per week. Caffeine was administered by gavage one hour before the training for 5 days a week. Animals were submitted to a period of six weeks to protocol exercise and caffeine treatment. Results showed no alterations in the ATP (10,14%), ADP (23,2%), AMP (45,89%) hydrolysis and ADA (27,33) activity in synaptossomes of cerebral cortex of trained rats (Grupo IV). However, when trained rats were treated with caffeine we observed a significant increase in the ADP, AMP hydrolysis and ADA activity in synaptossomes of the cerebral cortex (V and VI) when compared to other groups ($P < 0.05$). In relation to the AChE activity, we observed a decrease in the activity of this enzyme in synaptossomes from cerebral cortex in the trained group (IV) and in the animals from the groups V and VI when compared to the control group ($P < 0.05$). Exercise alone did not alter the AChE activity in homogenates from cerebral cortex, striatum, cerebellum or hippocampus (group IV). Group V showed a decrease in the AChE activity in hippocampus and an increase in the activity of this enzyme in striatum and cerebral cortex in relation to control ($P < 0.05$). In the animals from group VI, caffeine increased the AChE activity in cerebral cortex and in cerebellum in relation to other groups ($P < 0.05$). These findings suggest that caffeine modulates the purinergic and cholinergic signaling associated with high intensity exercise.

Keywords: high intensity exercise, caffeine, purinergic system, cholinergic system.

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table. 1.....	62
Table 2.....	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1 – Estrutura química da cafeína	20
Figura 2 – Ações da adenosina (ADO) no sistema nervoso central	22
Figura 3 – Formação extracelular da adenosina	24
Figura 4 – Tipos de receptores para nucleotídeos e nucleosídeos de adenina	26
Figura 5– Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina	26
Figura 6 – Membros da família da E-NTPDase.....	27
Figura 7 – 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)	29
Figura 8 – (A) Ilustração do sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico (PAS). (B) Interação do substrato com o sítio esterásico da AChE)	30
Figura 9 – Isoformas da acetilcolinesterase	32

Manuscrito

- Figura 1 - (A) NTPDase (ATP-hydrolysis) activities of cerebral cortex in synaptosomes of control group, untrained group and trained group. Data are presented as mean with SEM, Two-way ANOVA. Groups are statistically different (*) for $p < 0.01$, $n = 05$ to each group64
- Figura 1 - (B) NTPDase (ADP- hydrolysis) activities of cerebral cortex in synaptosomes of control group, untrained group, and trained group. Data are presented as mean with SEM, Two-way ANOVA. Groups are statistically different (*) for $p < 0.001$, $n = 04$ to each group64
- Figura 2 - (C) Ecto-5'-nucleotidase (AMP- hydrolysis) activities of cerebral cortex in synaptosomes of control group, untrained group, and trained group. Data are presented as mean with SEM, Two-way ANOVA. Groups are statistically different (*) for $p < 0.001$, $n = 05-06$ to each group.....65
- Figura 3 - (D) Adenosine deaminase activities of cerebral cortex in synaptosomes of control group, untrained group, and trained group. Data are presented as mean with SEM, Two-way ANOVA. Groups are statistically different (*) for $p < 0.05$, $n = 06$ to each group.....65
- Figura 4 - Acetylcholinesterase activities of cerebral cortex in synaptosomes of control group, untrained group, and trained group. Data are presented as mean with SEM, Two-way ANOVA. Groups are statistically different (*) for $p < 0.05$, $n = 06$ to each group.....66

LISTA DE ABREVIACOES

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AChRm – Receptores de acetilcolina muscarínicos

AChRn – Receptores de acetilcolina nicotínicos

ADA – Adenosina desaminase

ADO – Adenosina

AMP – Adenosina monofosfato

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

ATP-CP – Adenosina trifosfato - creatina fosfato

BHE – Barreira hematoencefálica

ChAT – Colina acetiltransferase

CHT – Transportador de colina

INO – Inosina

LL – limiar de lactato

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso Periférico

TACHV – Transportador de acetilcolina vesicular

VO2máx – Consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBEJETIVOS	33
2.1 Obejtivos gerais.....	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. MANUSCRITO	34
4. CONCLUSÃO	67
5. REFERÊNCIAS.....	69

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.

1. INTRODUÇÃO

A prática de exercícios físicos é um hábito importante para a manutenção do bem estar físico e emocional de quem o adota com regularidade. O exercício físico é uma atividade praticada de forma sistematizada, necessitando de um controle sobre frequência (número de vezes por semana), intensidade (velocidade, cargas) e volume (tempo, distância, número de séries e repetições), diferente de uma atividade física, a qual é praticada sem sistematização (Caspersen, Powell *et al.*, 1985).

A razão da prática de exercícios inclui benefícios tanto na aptidão física relacionada à saúde (resistência cardiorespiratória, força/resistência muscular e flexibilidade), quanto a aptidão física relacionada à performance (resistência cardiorespiratória, força/resistência muscular, flexibilidade, agilidade, potência, velocidade, coordenação e equilíbrio) (Everett, Kinser *et al.*, 2007). Assim, o exercício físico dependendo da sua duração, intensidade e ativação de sistemas específicos de fornecimento de energia pode ser dividido em: aeróbico e anaeróbico (Abreu, Silva-Oliveira *et al.*, 2011)

Os exercícios aeróbicos são caracterizados pela utilização de oxigênio (O₂) na respiração celular. Geralmente, são exercícios de longa duração, contínuos e de baixa intensidade. Este tipo de exercício aprimora a adaptação das fibras tipo I (vermelhas, de contração lenta) com grande capacidade oxidativa, alta densidade capilar e mitocondrial, e grandes estoques intracelulares de triglicérides o que lhes confere uma alta resistência (Maughan, 2005).

Os exercícios aeróbicos possuem um papel importante tanto na aptidão física relacionada à saúde quanto ao desempenho atlético, pois fornecem suporte fisiológico para que novas cargas de trabalho sejam implementadas (Tang, Sibley *et al.*, 2009; Armstrong, Tomkinson *et al.*, 2011). A realização do trabalho aeróbico se dá em grande parte pela cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, pela fosforilação oxidativa onde é gerado a maior parte dos ATPs consumidos (em ritmo aeróbico). Sendo assim, ao se iniciar um exercício aeróbico, o consumo de oxigênio aumenta muito nos primeiros minutos até atingir um estado estável (Steady State) onde se reflete o ponto de equilíbrio entre a energia necessária pelos músculos (consumo) e a produção pelo metabolismo aeróbico (Connett, 1988). Este

é o ponto em que todo o lactato gerado não se acumula sendo, posteriormente, reconvertido à glicose pelo ciclo de Cori (Barstow, 1994).

O consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) é o ponto em que ocorre um platô na utilização de oxigênio molecular, ou seja, aumenta-se o ritmo do exercício mas o consumo permanece inalterado.

Os exercícios anaeróbicos são, portanto, aqueles que apresentam curta duração e alta intensidade onde envolvem um esforço intenso produzido por fibras do tipo II (brancas, rápidas, IIa – intermediárias, e IIb – anaeróbicas) de alta capacidade metabólica anaeróbica, as quais possuem altos níveis intramusculares de ATP-PCr e glicogênio muscular como substrato energético predominante, e por isso, a limitação no tempo de esforço (Staron, Hagerman *et al.*, 2000). Este fornecimento de energia se dá pela degradação anaeróbica da glicose pela glicólise. Sob condições de hipóxia a produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH - reduzido) gerado pela glicólise anaeróbica é muito superior à capacidade da célula de regenerar o NADH em nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+ - oxidado) (Katz e Sahlin, 1988). Este excesso na produção de NADH resulta na redução da molécula de piruvato a lactato pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Katz e Sahlin, 1990). Quando a intensidade do exercício é aumentada, o lactato sanguíneo começa a acumular-se exponencialmente no sangue (limiar de lactato) (Gladden, 1991). A partir deste ponto para que o exercício continue será necessário o fornecimento de energia por processos metabólicos que não envolvem o oxigênio (Edwards, Challis *et al.*, 1999), caracterizando assim o exercício anaeróbico.

Através da utilização de alguns parâmetros fisiológicos como o consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) e frequência cardíaca máxima (FCmax) são realizados testes de esforço máximo para avaliar a concentração de lactato sanguíneo, sendo possível classificar o exercício físico como leve (25-50% $VO_{2máx}$), moderado (50-70% $VO_{2máx}$), moderado-intenso (70-85% $VO_{2máx}$) e intenso-muito intenso (> 85% $VO_{2máx}$) (Borg, 1982; Leandro, Martins De Lima *et al.*, 2006).

O exercício físico de alta intensidade realizado acima do limiar de lactato gera ácido láctico e, assim, uma série adaptações à célula (Tomlin e Wenger, 2001). Este tipo de exigência é muito importante em situações que solicitam de imediata produção de energia como, por exemplo, corridas rasas (100 a 200m), natação (25m, 50m) levantamento de pesos, atividades de força e potência anaeróbica, pois

utilizam como fonte energética principalmente ATP e creatina fosfato (PCr) (Weiler-Ravell e Whipp, 1983; Wiley e Rhodes, 1986; Gatin, 2001). Este tipo de exercício também produz uma série de benefícios ao corpo humano como aumento da capacidade de enzimas glicolíticas ou oxidativas do músculo, do volume plasmático, do volume sistólico, da densidade capilar, de mioglobina (Laursen e Jenkins, 2002) aumento de enzimas mitocondriais (Tabata, Nishimura *et al.*, 1996), aumentos nos níveis de glicogênio (Matsui, Ishikawa *et al.*, 2012) sensibilidade à insulina - AMPKc (Koshinaka, Kawasaki *et al.*, 2009), resistência vascular periférica, angiogênese (Rakobowchuk, Tanguay *et al.*, 2008), memória (Berchtold, Chinn *et al.*, 2005). Além disso, facilita a neuroplasticidade através do aumento na expressão de receptores DA-D2RS na região estriatal (Vuckovic, Li *et al.*, 2010).

Seguindo, então, os princípios do treinamento físico (sobrecarga, especificidade, individualidade biológica, reversibilidade), o exercício físico serve para aprimorar o desempenho e condições fisiológicas (Dorossiev, 1978). O treinamento anaeróbico, então, promove uma série de alterações nos sistemas de fornecimento de energia. Por necessitar de energia à curto prazo devido a alta sobrecarga, alterações específicas no sistema de fornecimento de energia promovem aumento nas funções aeróbicas (Tabata, Nishimura *et al.*, 1996; Burgomaster, Hughes *et al.*, 2005; Terada, Kawanaka *et al.*, 2005) bem como atua nos processos de biogênese mitocondrial no músculo e no SNC (Steiner, Murphy *et al.*, 2011; Zhang, Wu *et al.*, 2012). O treinamento anaeróbico, ou seja, de alta intensidade proporciona aumentos nos níveis de substratos (em músculo em repouso) após treinamento de potência, aumentos de ATP - CP, Creatina livre, glicogênio e 28% na força muscular (Stauber, 1989; Nosaka e Clarkson, 1997), melhorando também a atividade das enzimas como citrato sintase (Bexfield, Parcell *et al.*, 2009) e acetil-CoA carboxilase (Koshinaka, Kawasaki *et al.*, 2009).

Em relação aos efeitos do exercício físico no sistema nervoso central (SNC), muitos estudos têm demonstrado que o exercício físico principalmente o moderado é capaz de promover uma série de alterações em nível cerebral, tais como: aumentar a expressão de receptores muscarínicos em hipocampo de ratos (Chen e Liao, 1998) e de fatores neurotróficos (BDNF) (Shen, Tong *et al.*, 2001; Cotman e Berchtold, 2002), aumentar a plasticidade neuronal (Shen, 2001); bem como melhorar a vascularização cerebral, estimular a neurogênese e a capacidade de

aprendizado, contribuindo assim para a manutenção da função cognitiva durante a vida (Contman e Berchtold, 2002). Apesar disso, existem poucos estudos na literatura que avaliam os efeitos do exercício de alta intensidade ou anaeróbico no SNC. Alguns autores (Burgomaster, Hughes *et al.*, 2005; Gibala, Little *et al.*, 2006; Rakobowchuk, Tanguay *et al.*, 2008) tem demonstrado que esse tipo de exercício é capaz de estimular importantes adaptações tanto no SNC, principalmente ligadas a neurogênese, bem como no sistema cardiovascular (Swain, Harris *et al.*, 2003; Swain e Franklin, 2006; Van Der Borght, Kobor-Nyakas *et al.*, 2009). Entretanto os mecanismos pelo qual o exercício de alta intensidade afeta as funções cerebrais ainda não é bem entendido. Sendo assim, torna-se importante estudar esses efeitos uma vez que na sociedade atual há cada vez menos tempo para a prática de “atividade” física e este tipo de estratégia torna-se um importante aliado na promoção à saúde.

Vários trabalhos descritos na literatura têm relacionado o exercício físico seja ele de alta intensidade ou de endurance (resistência) com uso de substâncias que melhoram o desempenho físico ou atenuam os mecanismos de fadiga. Essas substâncias são denominadas de recursos ergogênicos (Thein, Thein *et al.*, 1995).

Desde a década de 70 a cafeína vem sendo investigada por diversos pesquisadores em relação à possibilidade de exercer efeito ergogênico em exercícios de longa duração (Graham, Rush *et al.*, 1994).

A cafeína é um alcaloide purínico derivado do grupo das metil-xantinas, conhecida quimicamente como 1,3,7- trimetilxantina (C₈H₁₀N₄O₂) (Zulak, Liscombe *et al.*, 2007) (Figura 1). Caracteriza-se por ser um pó branco, cristalino, com sabor muito amargo, sem cheiro e com aspecto brilhante. É uma substância de fácil acesso a população sendo consumida em sua maior parte através de cafés, chocolates, chás e bebidas energéticas (Arnaud, 2006; Mccusker, Goldberger *et al.*, 2006).

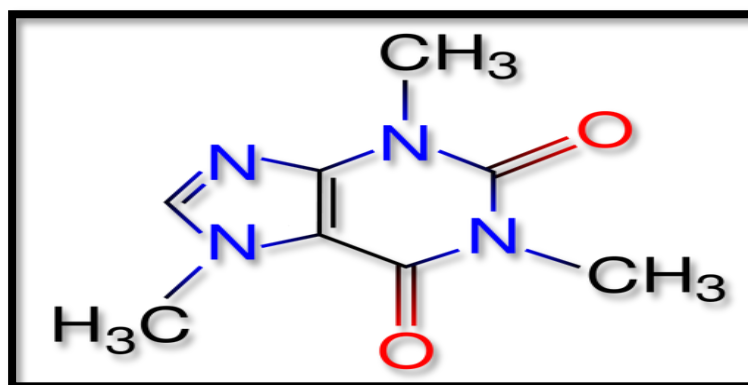


Figura 1: Estrutura química da cafeína. Adaptado de Ashihara, et. al., (2008).

A cafeína é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal, e após sua ingestão pode atingir o pico na concentração plasmática entre 15 e 120 minutos (Sinclair e Geiger, 2000). Desta forma, a maioria dos estudos relata administração oral entre 30 e 60 minutos antes do exercício.

A metabolização da cafeína ocorre no fígado, principalmente, no citocromo P450 (enzima) CYP 1A2 (isoforma) onde ocorre a desmetilização na posição 3 formando o principal metabólito (84%): paraxantina (Ursing, Wikner *et al.*, 2003). Devido a este processo, o catabolismo da cafeína leva aproximadamente de 4 a 6 horas, dependendo da dose (Van Soeren e Graham, 1998). Além disso, alguns fatores como sexo, idade, uso de cigarros e álcool, dieta, gravidez, uso de agentes contraceptivos e exercícios podem alterar o seu metabolismo (Jusko, Gardner *et al.*, 1979; Benowitz, Hall *et al.*, 1989; Collomp, Anselme *et al.*, 1991).

Sendo utilizada há séculos como um psicoestimulante (Walsh, Muehlbach *et al.*, 1990) a cafeína por possuir propriedades lipofílicas, ultrapassa a barreira hematoencefálica e assim estimula o SNC (Chen e Pedata, 2008), inibindo as fosfodiesterases, bloqueando receptores GABA e mobilizando cálcio intracelular (Ribeiro e Sebastiao, 2010). Além da sua propriedade estimulante (Fisone, Borgkvist *et al.*, 2004) outros estudos também tem descrito propriedades antioxidantes (Abreu, Silva-Oliveira *et al.*, 2011) e neuroprotetoras dessa metilxantina (Rosso, Mossey *et al.*, 2008).

Estudos prévios tem relatado que doses entre 3 e 30 mg/kg, a cafeína é capaz de estimular o SNC a liberar neurotransmissores como catecolaminas (Van Soeren e Graham, 1998), dopamina (Solinas, Ferre *et al.*, 2002), acetilcolina (Carter, O'connor *et al.*, 1995), glutamato (Wang, 2007) serotonina, ácido gama-

aminobutírico, e ainda aumentar a expressão de receptores A1 de adenosina (Shi, Nikodijevic *et al.*, 1993). Esses efeitos podem melhorar o estado de atenção, aprendizagem, memória e outras funções cognitivas (Arnaud, 2006). No entanto, em altas doses (maiores que 25mg/kg), esta metilxantina atua no sistema neuroendócrino através da mediação de corticosteroides em soro, beta-endorfinas (Plaskett e Cafarelli, 2001) e promove diminuição nos níveis de tireotrofina e homônimos do crescimento (GH), contudo, estes efeitos são temporários (Spindel, 1984). Além disso, doses acima de 15 mg/kg parecem induzir dores de cabeça, ansiedade, irritabilidade, tremores musculares, palpitação, taquicardia e enjoos (Bracco, Ferrarra *et al.*, 1995). Desta forma, é importante ressaltar que a cafeína possui efeito bifásico, ou seja, doses muito elevadas acima de 25 mg/kg podem inibir os efeitos mediados por doses mais baixas (Fredholm, Battig *et al.*, 1999).

Embora o consumo de cafeína visando a efeitos estimulantes data de muitos séculos, a sua utilização por atletas com a intenção de melhorar a performance tem se tornado popular nas últimas décadas, devido aos estudos sobre seus efeitos ergogênicos (Graham e Spriet, 1991; Graham, Hibbert *et al.*, 1998). Diversos trabalhos têm proposto que a ingestão de 3 à 9 mg/kg de cafeína pode retardar o processo de fadiga durante o exercício intenso prolongando a atividade em torno de 20 a 50% (Spriet, Maclean *et al.*, 1992; Graham Te, 1998; Greer, Mclean *et al.*, 1998; Davis, Zhao *et al.*, 2003).

Um dos principais mecanismos que tem sido usado para explicar o potencial ergogênico da cafeína durante o exercício se refere a sua ação poupadora de glicogênio devido à mobilização ácidos graxos livres do tecido adiposo (Costill, Dalsky *et al.*, 1978). Contudo, alguns trabalhos afirmam que não há evidências de que a cafeína atue como poupadora de glicogênio muscular ou aumente a oxidação de ácidos graxos (Graham, Battram *et al.*, 2008). Embora a cafeína, em baixas doses (5,5 mg/kg), mobilize ácidos graxos livres do tecido adiposo através do bloqueio seletivo dos receptores A1 não há base científica de que a cafeína exerça ação sobre o metabolismo dos ácidos graxos e carboidratos, uma vez que, as concentrações de glicogênio muscular, glicose - 6 - fosfato (G-6-P), acetil - CoA e citrato não apresentam diferenças significativas entre grupos exercitados com e sem o uso de cafeína. Curiosamente, esta metilxantina aumentou a concentração de

AMPC durante o exercício (70-85% do $VO_{2máx}$) o que se explica pelo antagonismo aos receptores A1 do músculo esquelético (Graham, Battram *et al.*, 2008).

Durante o exercício submáximo a cafeína parece reduzir a percepção à dor, retardando o processo/sensação de fadiga (O'connor, Motl *et al.*, 2004; Gliottoni, Meyers *et al.*, 2009). Sendo assim, alguns estudos atribuem a manutenção da força durante o exercício devido à redução da percepção de dor, provocando modificações em nível central e, conseqüentemente, em nível periférico. Desta forma, acredita-se que a cafeína possua mecanismo de ação central e periférica melhorando o desempenho atlético (Graham, 2001), principalmente, durante exercícios de baixa intensidade. Contudo, existem muitas controvérsias do seu efeito, a respeito dos tipos e modelos aplicados (Tarnopolsky, 2008).

A hipótese atual mais aceita é a de que a cafeína atue bloqueando os receptores de adenosina presentes no SNC, podendo assim retardar a sensação de fadiga durante exercício físico (Graham, Battram *et al.*, 2008; Davis e Green, 2009). Existem quatro tipos de receptores de adenosina A1, A2a, A2b e A3, os quais estão acoplados a proteínas G (Fredholm, Arslan *et al.*, 2000). No SNC, ao se ligar a esses receptores a adenosina desempenha muitas funções fisiológicas importantes, dentre elas destacam-se a ação neuromoduladora e neuroprotetora (Latini e Pedata, 2001; Chen e Pedata, 2008; Gomes, Kaster *et al.*, 2011). Sendo assim, esta molécula vem sendo muito estudada tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Yegutkin, Samburski *et al.*, 2006; Ribeiro e Sebastiao, 2010) (Figura 2).

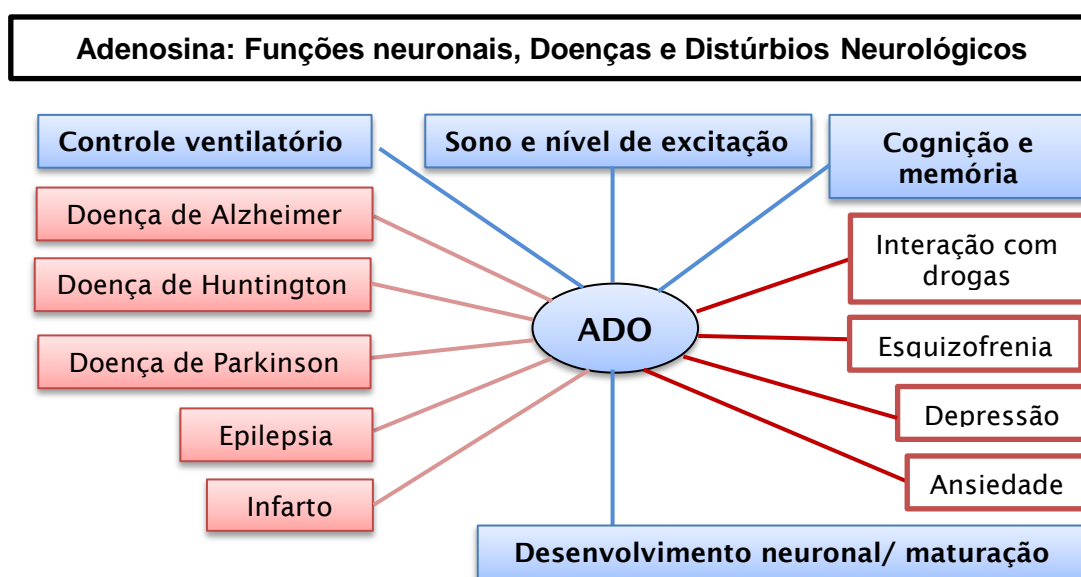


Figura 2: Ações da adenosina (ADO) no sistema nervoso central. Adaptado de Ribeiro & Sebastião (2010).

A cafeína atua bloqueando receptores A1 de adenosina seletivamente e A2a não seletivamente (Gomes, Kaster *et al.*, 2011). Os receptores A1 são responsáveis pela, inibição da liberação de neurotransmissores, insulina/glucagon, sono, redução do ritmo cardíaco e analgesia (Fredholm, 2010). Sendo assim, o bloqueio dos receptores A1 pela cafeína ativa a transmissão excitatória (Gomes, Kaster *et al.*, 2011). Já os receptores A2a, os quais são bloqueados de forma não seletiva, respondem pela atividade locomotora, processos neurodegenerativos (doenças de Parkinson e Alzheimer), imunossupressão, vasodilatação, angiogênese e inibição da agregação plaquetária (Fredholm, 2010; Gomes, Kaster *et al.*, 2011). Uma vez que, a cafeína antagoniza estes efeitos seu potencial terapêutico também tem sido amplamente estudado. Ao impedir que a adenosina se ligue a um receptor A2a a cafeína tem sido alvo de muitas pesquisas que envolvem doenças como Alzheimer, Parkinson, Epilepsia e Depressão (Gomes, Kaster *et al.*, 2011). É interessante notar que a expressão de receptores A1 de adenosina é aumentada após o uso crônico da cafeína, o mesmo não ocorre com os receptores A2a (Jacobson, Von Lubitz *et al.*, 1996). Este desequilíbrio na razão A1/A2a de adenosina que serve de base para indicar a tolerância aos efeitos da cafeína na atividade motora após tratamento crônico (Ciruela, Casado *et al.*, 2006)

Por ser um componente chave na neuromodulação a adenosina possui um nível basal. Sendo assim, em situações de estresse (exercício intenso/trauma tecidual) os níveis de adenosina começam a subir (Andine, Rudolphi *et al.*, 1990; Fredholm, 2010). As concentrações de adenosina se elevam por diferentes mecanismos: (1) formação intracelular e exportação via transportadores; (2) formação de adenosina no espaço extracelular através da degradação dos nucleotídeos de adenina (Figura 3) (Pedata *et al.*, 2007).

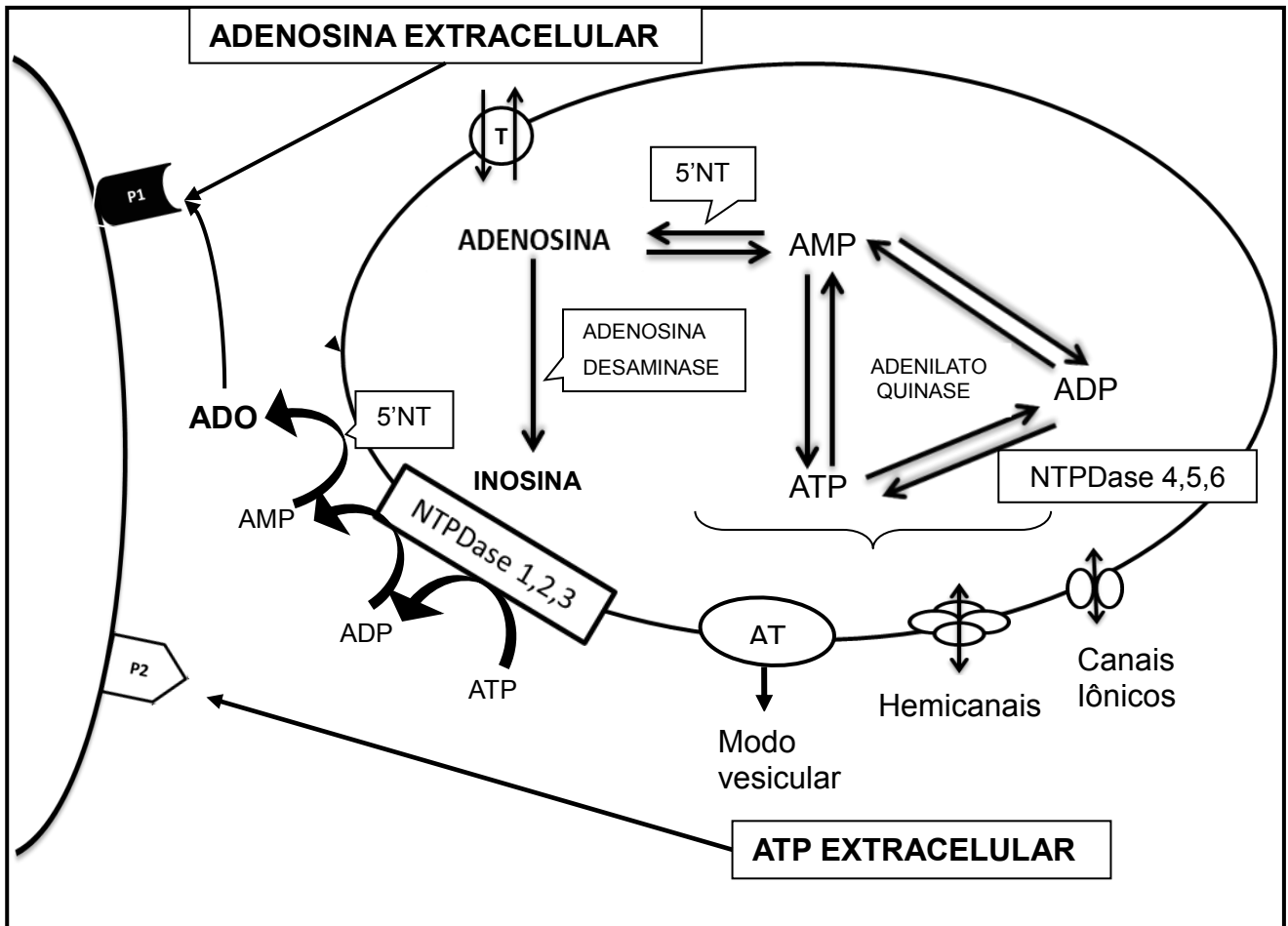


Figura 3: Formação extracelular da adenosina. Adaptado de Pedata et al. (2007).

A adenosina, então, é formada intracelularmente sempre que houver diferenças entre síntese e degradação de ATP, ou seja, quando há um aumento na demanda energética e o suprimento de glicose ou oxigênio for limitado (Lloyd, Lindstrom *et al.*, 1993; Fredholm, 2010). Desta forma, altos níveis extracelulares de adenosina transmitem sinais parácrinos destinados a coordenar a atividade metabólica em grupos de células que formam tecidos (Shryock e Belardinelli, 1997; Bours, Swennen *et al.*, 2006; Gomes, Kaster *et al.*, 2011). Assim, a utilização de antagonistas como as metilxantinas podem aumentar os níveis extracelulares de adenosina podendo ser utilizados com alto potencial terapêutico bloqueando receptores de adenosina. Contudo, não há certeza do desenvolvimento de medicamentos para bloquear especificamente cada receptor de adenosina. Uma vez que, estes receptores estão presentes em todas as células e tecidos seus efeitos indesejados devido à ação de seus agonistas serão propagados.

Além da adenosina, os nucleotídeos de adenina ATP, ADP também são considerados importantes moléculas sinalizadoras em vários tecidos (Yegutkin, 2008). Tem sido demonstrado que o ATP, o ADP juntamente com a adenosina regulam processos relacionados à trombo-regulação, modulam respostas imunes e inflamatórias e sinalizam vias que são cruciais para o funcionamento e desenvolvimento do SNC (Burnstock, 2002)

O papel do ATP e da adenosina na neurotransmissão e na neuromodulação encontra-se bem estabelecido. O ATP é um neurotransmissor excitatório nas sinapses nervosas purinérgicas, podendo ser também coliberado juntamente com outros neurotransmissores como a acetilcolina e a noradrenalina (Halliday e Gibb, 1997; Burnstock, 2006) enquanto que adenosina age na neuromodulação regulando a liberação de vários neurotransmissores (Dunwiddie e Masino, 2001). Além disso, tem sido demonstrado que estas moléculas também estão envolvidas na sinaptogênese, na plasticidade neuronal e na proliferação de células gliais (Rathbone, Middlemiss *et al.*, 1999; Neary e Zimmermann, 2009).

Todas essas ações dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina são mediadas através de receptores purinérgicos localizados na superfície de vários tipos de células (Yegutkin, 2008). Esses receptores dividem-se em dois grupos: P2X e P2Y. Os receptores P2X são acoplados a canais iônicos com seus domínios carboxi e aminoterminal voltados para o meio intracelular e compreendem sete subtipos nomeados de P2X₁₋₇ (Yegutkin, 2008). Os receptores P2Y são acoplados a proteína G apresentando sete regiões transmembrana com a porção aminoterminal voltada para meio extracelular e a porção carboxiterminal voltada para o meio citoplasmático compreendendo 14 subtipos os quais foram nomeados de P2Y₁₋₁₄ (Burnstock, 2007, Yegutkin, 2008). Os receptores para adenosina incluem quatro tipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, os quais são proteínas transmembrana acoplados a proteína G (Figura 4) (Zimmermann, 2011)

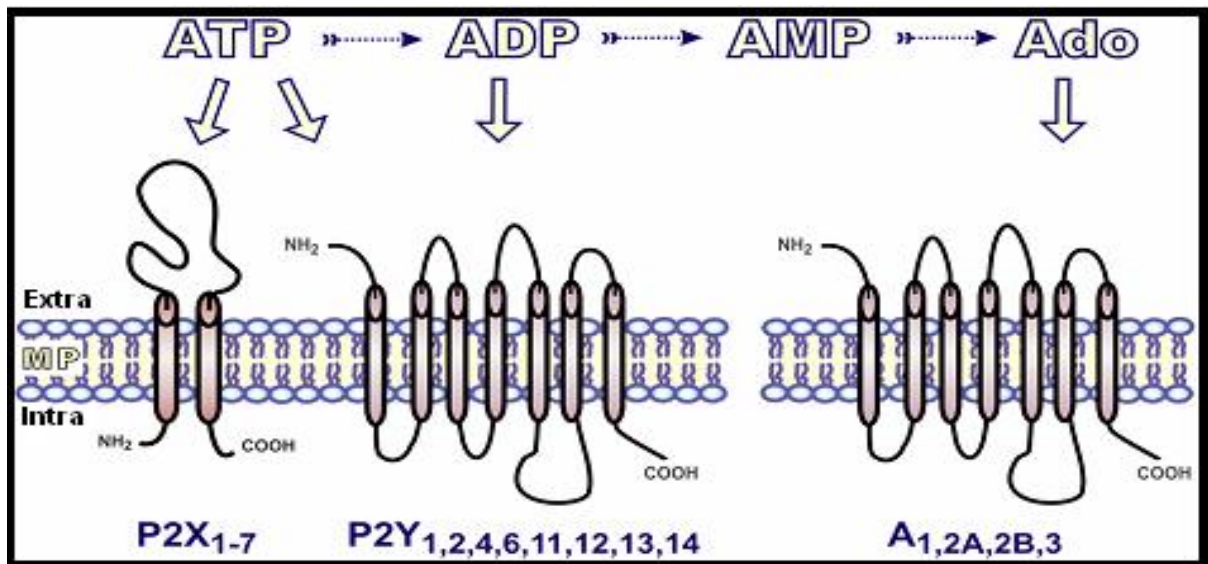


Figura 4 - Tipos de receptores para nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. Adaptado de Yegutkin, (2008).

O controle dos níveis extracelulares de ATP, ADP e adenosina e a consequente sinalização purinérgica por eles induzida através de seus receptores, é realizada por uma variedade de enzimas ancoradas na membrana celular (Zimmermann, 2008). Dentre estas enzimas pode-se destacar as E-NTPDases (Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase), 5'-nucleotidase e a adenosina deaminase (ADA) (Robson, Seigny *et al.*, 2006; Yegutkin, 2008).

Estas enzimas atuam em conjunto, formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDases, as quais catalisam a hidrólise de ATP e do ADP formando AMP (Zimmermann, 2008). A seguir a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa a molécula de AMP formando adenosina, a qual posteriormente é degradada pela ação da ADA gerando inosina (Figura 5) (Yegutkin, 2008).

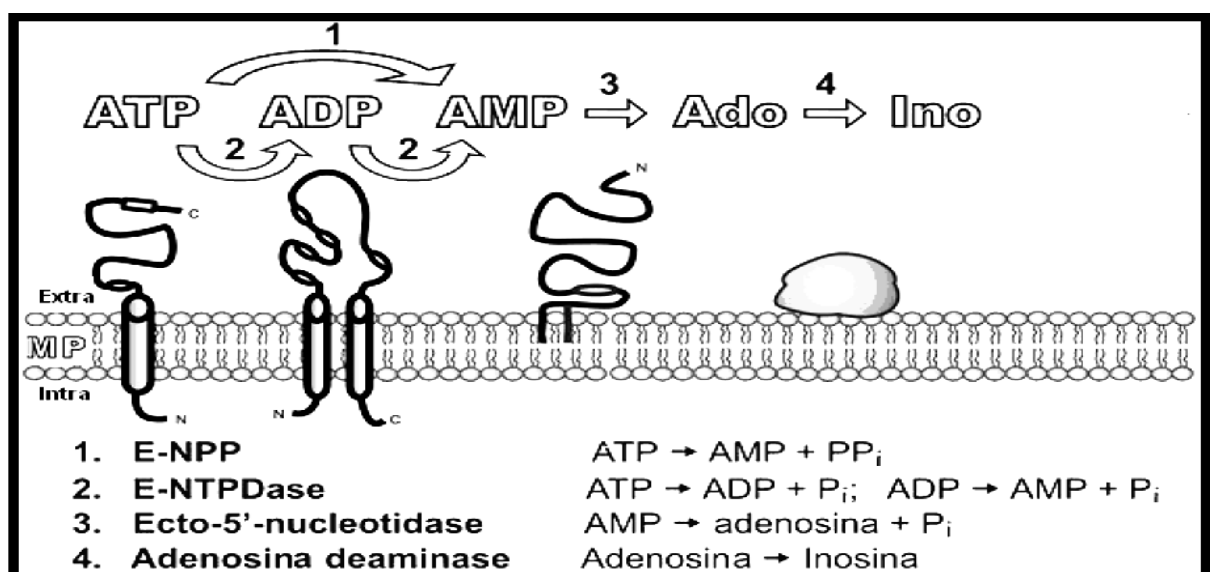


Figura 5: Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. Adaptado de Yegutkin (2008).

As E-NTPDases constituem uma família de oito (“ecto”) enzimas das quais quatro (NTPDase 1, 2, 3 e 8) localizam-se aderidas a membrana celular (Robson, Sevigny *et al.*, 2006), enquanto que as outras quatro enzimas (NTPDase 4, 5, 6 e 7) caracterizam-se por apresentar localização intracelular (Zimmermann, 2008). As E-NTPDases 1,2,3 e 8 são proteínas transmembrana do tipo 2 com cerca de 500 resíduos de aminoácidos que compartilham 5 “regiões conservadas de apirase” (ACRs) (Figura 6) (Zimmermann, 2000; Robson, Sevigny *et al.*, 2006).

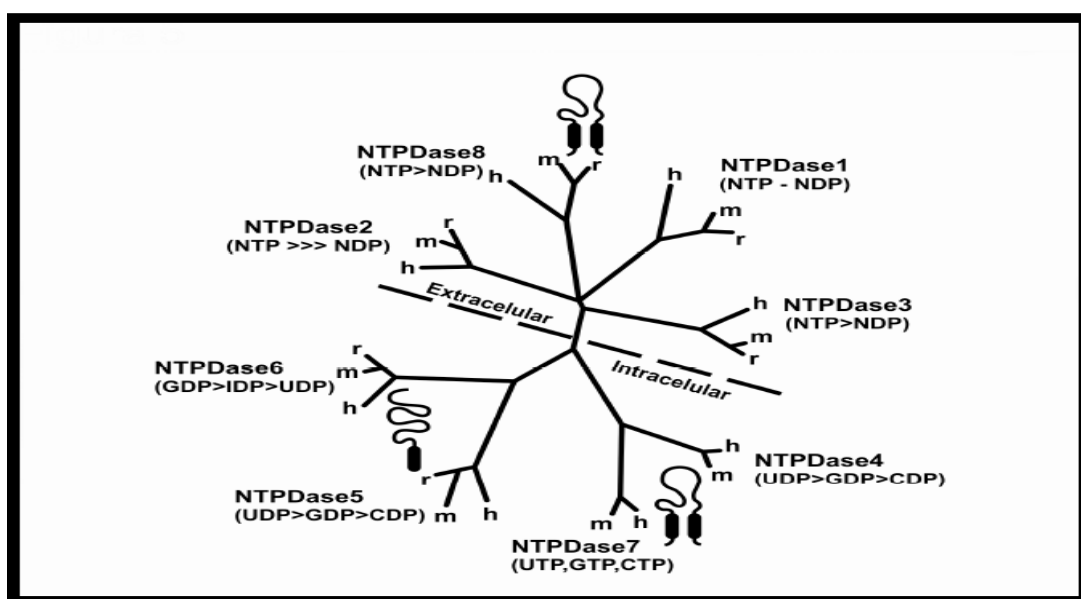


Figura 6: Membros da família da E-NTPDase. Adaptado de Robson, Sevigny *et al.*, (2006).

Desta forma, as E-NTPDases constituem uma família importante na cascata purinérgica podendo ser modulada por citocinas inflamatórias, hipóxia, estresse oxidativo, AMPc e, claro, por nucleotídeos (Robson, Sevigny *et al.*, 2006). A NTPDase 1 hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (Zimmermann, 1996; Yegutkin, Henttinen *et al.*, 2001; Robson, Sevigny *et al.*, 2006). Além disto, esta enzima tem pH ótimo entre 7 e 10 e além do SNC é expressa em várias outras células como por exemplo em células endoteliais, plaquetas e linfócitos (Kukulski, Levesque *et al.*, 2011).

A ecto-5'-nucleotidase (CD73) é responsável por hidrolisar eficientemente o AMP à adenosina. Esta enzima está localizada ancorada à membrana plasmática via uma molécula de glicofosfatidil inositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Zimmermann, 1996; Deaglio e Robson, 2011). Está presente em vários tecidos como pulmão, rim, fígado, encéfalo, células do sistema imune e

musculatura lisa (Colgan, Eltzhig *et al.*, 2006; Yegutkin, 2008; Abbracchio, Burnstock *et al.*, 2009) e seu papel fisiológico tem sido atribuído, principalmente, à produção da adenosina, sendo que dependendo da localização tecidual a 5'-nucleotidase vai possuir diferentes papéis fisiológicos (Deaglio, Dwyer *et al.*, 2007; Yegutkin, 2008).

A adenosina produzida pela ecto-5'-nucleotidase é posteriormente degradada pela ação da ADA. Esta enzima promove a desaminação da adenosina à inosina (INO) sendo a principal enzima responsável por regular as concentrações extracelulares desse nucleosídeo (Acosta Maldonado, De Carvalho Correa *et al.*, 2008).

Nos últimos anos o papel dessas enzimas tem sido avaliado em muitas condições patológicas bem como em modelos experimentais, entretanto existem poucos estudos que avaliam os efeitos do exercício físico na atividade dessas enzimas no SNC. Trabalhos prévios tem demonstrado que um protocolo de exercício moderado (corrida em esteira) por duas semanas 20 min/dia reduz a hidrólise de ATP e ADP em sinaptossomas de hipocampo de ratos (Siqueira, Elsner *et al.*, 2010). Uma diminuição na hidrólise de ADP e AMP em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos após um mês de exercício também foi relatado por (Ben, Soares *et al.*, 2009). Esses dados sugerem que o exercício pode modular a atividade das ectonucleotidases em SNC, entretanto, o efeito de um protocolo de exercício de alta intensidade na atividade dessas enzimas não foi encontrado na literatura.

Da mesma forma os efeitos da cafeína na hidrólise dos nucleotídeos de adenina também tem sido pouco documentado na literatura. Da Silva e colaboradores (2003) verificaram o efeito da cafeína na NTPDase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de hipocampo e estriado de ratos. Administrada na água de beber durante 14 dias nas concentrações de 0,3 g/L ou 1 g/L, a cafeína, não afetou a hidrólise dos nucleotídeos. Entretanto a administração (aguda) intraperitoneal (ip) de 30 mg/kg de cafeína foi capaz de aumentar a hidrólise de ATP (50%) e ADP (32%), respectivamente, em sinaptossomas de hipocampo e estriado de ratos (Da Silva, Bruno *et al.*, 2003). Esses efeitos na atividade das ectonucleotidases pela cafeína têm sido atribuídos como um mecanismo compensatório devido ao efeito antagonista dessa molécula nos receptores de adenosina. Entretanto os mecanismos pelo qual isso ocorre não são bem esclarecidos.

Em muitos terminais nervosos, o ATP pode ser co-liberado juntamente com outros neurotransmissores como noradrenalina, glutamato e acetilcolina (ACh). A ACh é um neurotransmissor excitatório sintetizado pela enzima colina acetiltransferase (ChAT; E.C. 2.3.1.6) a partir de uma molécula de colina e acetil-CoA (Tucek, 1967). Após o potencial de ação, a ACh é liberada na fenda sináptica ligando-se a seus receptores nicotínicos e muscarínicos produzindo seus efeitos (Descarries, Gisiger *et al.*, 1997). Este neurotransmissor está envolvido em vários processos fisiológicos como aprendizagem, memória, processamento da informação sensorial, organização cortical do movimento, controle do fluxo sanguíneo cerebral e diferenciação pós-sináptica. (Silman e Sussman, 2005).

A acetilcolina ao ser liberada na fenda sináptica é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) em colina e acetato. A colina excedente é recaptada no terminal do neurônio pós-sináptico por um transportador de colina (CHT) sendo, posteriormente, reconvertida e armazenada em vesículas no neurônio pré-sináptico em uma nova molécula de ACh (Figura 7) (Soreq e Seidman, 2001; Mesulam, Guillozet *et al.*, 2002; Zimmermann, 2008).

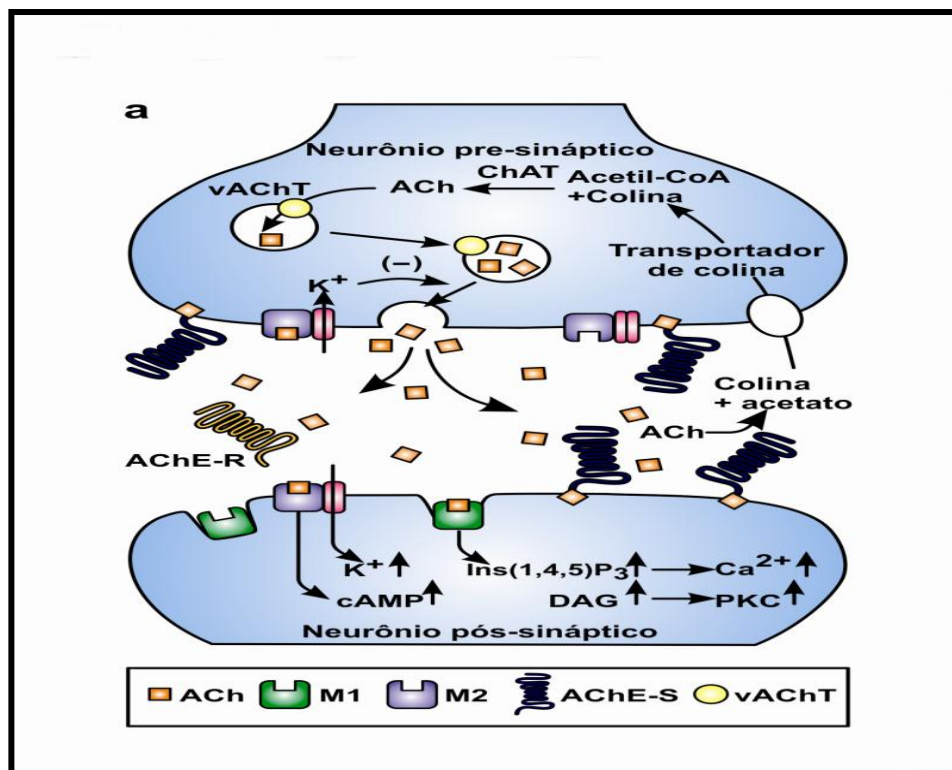


Figura 7: Esquema de uma sinapse colinérgica: Acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase sináptica (AChE-S), receptor muscarínico do tipo 1 (M1), receptor muscarínico do tipo 2 (M2), transportador de ACh vesicular (TACHV). Adaptado de Soreq & Seidman, (2001).

A AChE é expressa em diversos tecidos dentre eles o encéfalo, junção neuromuscular, eritrócitos e linfócitos possuindo um importante papel na regulação dos eventos fisiológicos promovidos pela ACh (Soreq e Seidman, 2001). Esta enzima hidrolisa preferencialmente ésteres de colina contendo em seu sítio catalítico resíduos de serina, histidina e glutamato. Na tríade catalítica da AChE, é encontrado um estreitamento semelhante a uma garganta (*gorge*) a uma profundidade de 20Å. Este sítio ativo é formado de dois subsítios de ligação. Um subsítio negativo ou aniônico, ao qual se liga a cadeia de nitrogênio quaternário -N+(CH₃)₃ da ACh positivamente carregada, e outro subsítio esterásico contendo tríade catalítica (Soreq e Seidman, 2001; Dvir, Silman *et al.*, 2010) (Figura 8).

O primeiro passo, em qualquer reação envolvendo a catálise enzimática, é a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima (complexo enzima-substrato). Neste caso, a ligação da acetilcolina ao sítio ativo da AChE ocorre por ligação iônica de um resíduo de aspartato/glutamato e ligação de um hidrogênio a o resíduo de tirosina. Isto é facilitado pelas interações entre o substrato e as cadeias laterais aminoácidos da enzima. No segundo passo, os fragmentos carregados negativamente podem interagir de maneira favorável com os grupos amino, carregados positivamente (estabilização). A histidina próxima do fragmento serina pode estabilizar a conformação do sítio ativo através de pontes de hidrogênio (Rosenberry, 2010; Zhou, Wang *et al.*, 2010).

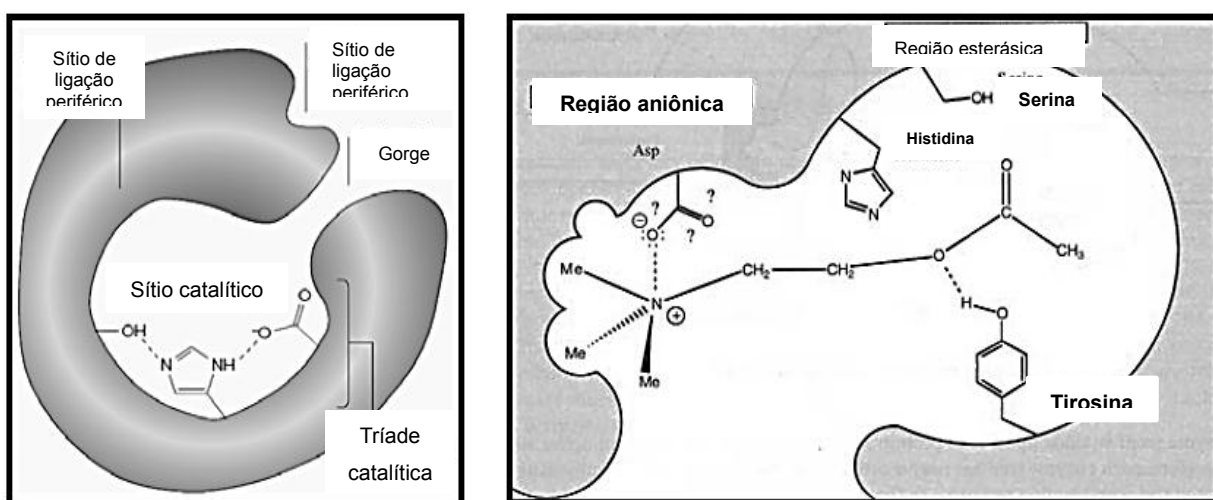


Figura 8: (A) Ilustração do sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico (PAS) Adaptado de Soreq & Seidman (2001). (B) Interação do substrato com o sítio esterásico da AChE. Adaptado de Patric (2001).

A AChE existe sob duas formas: assimétrica e globular, dependendo de sua conformação. A primeira consiste de quatro tetrâmeros (A4, A8 e A12) catalíticos ligados de forma covalente a uma subunidade de colágeno denominada Q (ColQ). A segunda (forma globular), cada subunidade catalítica é formada por monômeros (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4). No tecido nervoso a forma G1 é a forma citosólica enquanto que a G4 é aderida a membrana. (Figura 9) (Dvir, Silman *et al.*, 2010).

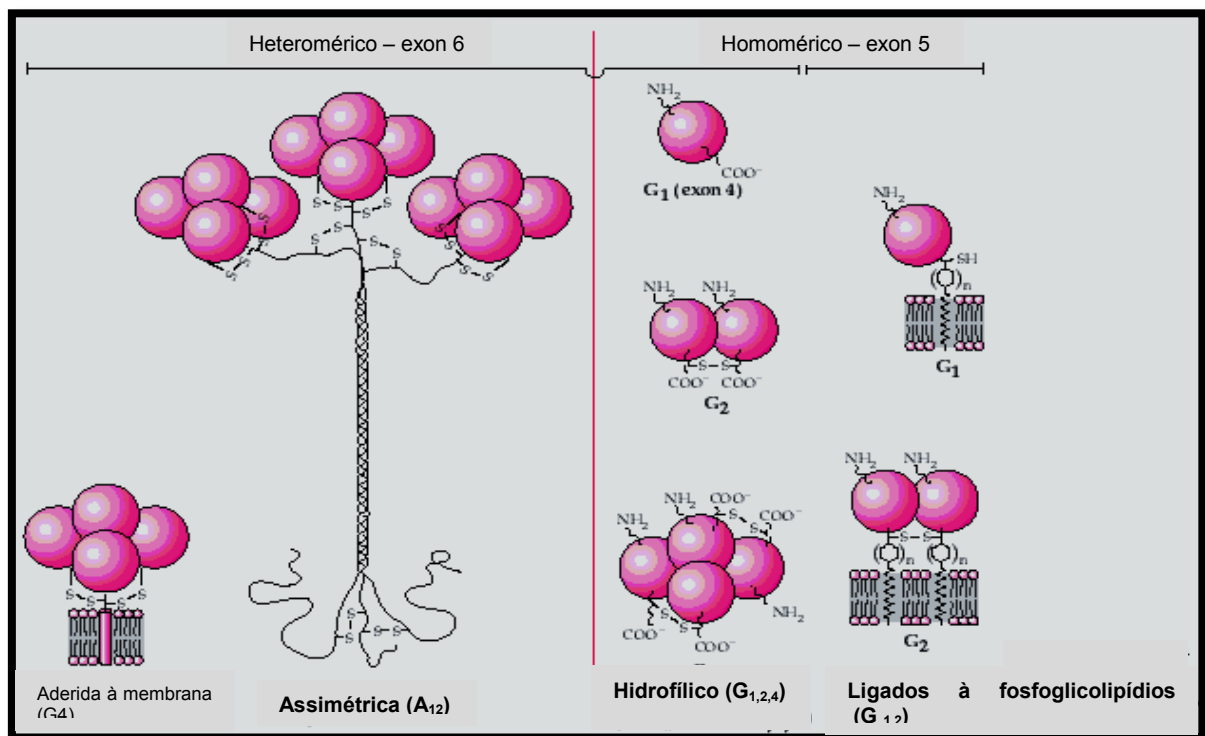


Figura 9: Isoformas da acetilcolinesterase.

Disponível em: http://www.chemistry.emory.edu/justice/test/ach_inactivation.htm

A AChE é uma das mais eficientes enzimas conhecidas que rapidamente hidrolisa o neurotransmissor ACh nas sinapses colinérgicas bem como na junção neuromuscular. Além da sua propriedade catalítica, a AChE tem potentes efeitos na adesão celular, extensão neurítica (Siow, Xie *et al.*, 2005) e diferenciação pós sináptica (Paraoanu e Layer, 2008), sendo por isso considerada o marcador bioquímico mais importante da sinalização colinérgica no SNC. Além disso, vários estudos tem demonstrado que a AChE possui também muitas funções não neuronais incluindo diferenciação hematopoiética (Deutsch, Pick *et al.*, 2002) e regulação da função imune (Kawashima e Fujii, 2003; Da Silva, Monteiro *et al.*, 2011).

Como consequência desse seu papel fisiológico chave a AChE tem sido bastante estudada durante os últimos anos (Dvir, Silman *et al.*, 2010; Thome, Spanevello *et al.*, 2011; Jaques, Rezer *et al.*, 2012). Essa enzima constitui-se em um importante alvo terapêutico no combate a desordens neuromusculares bem como para melhorar a deficiência colinérgica associada com doenças neurodegenerativas (Silman e Sussman, 2005). Além disso, nosso grupo tem pesquisa tem demonstrado que a atividade dessa enzima encontra-se alterada no SNC de animais submetidos a modelos experimentais de diabetes (Deutsch, Pick *et al.*, 2002; Schmatz, Mazzanti *et al.*, 2009) bem como durante a exposição de metais (Goncalves, Fiorenza *et al.*, 2010) e tratamento com substâncias naturais (Jaques, Rezer *et al.*, 2011; Schmatz, Perreira *et al.*, 2012).

Sendo assim, considerando que o exercício de alta intensidade promove uma série de adaptações fisiológicas no corpo humano como formação de novos neurônios, aumento na expressão de enzimas glicolíticas e oxidativas, angiogênese, bem como melhoras na transmissão sináptica e na plasticidade neuronal, a cafeína também tem sido utilizada como um bloqueador nos receptores de adenosina prolongando a atividade física. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do exercício físico de alta intensidade associado ou não ao tratamento com cafeína na atividade de enzimas que são cruciais para o funcionamento do SNC como a NTPDase, a 5'-nucleotidase, a adenosina desaminase e a acetilcolinesterase.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com cafeína na atividade de enzimas que hidrolisam nucleotídeos de adenina e atividade da AChE em encéfalo de ratos submetidos a um protocolo de exercício de alta intensidade.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina desaminase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos, submetidos ao exercício de alta intensidade e/ou tratados com cafeína.
- Determinar a atividade da enzima acetilcolinesterase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos, submetidos ao exercício de alta intensidade e/ou tratados com cafeína.
- Analisar a atividade da acetilcolinesterase em homogeneizado de córtex cerebral, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos, submetidos ao exercício de alta intensidade e/ou tratados com cafeína.

3. MANUSCRITO

Effects of caffeine on the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in brain of rats submitted to high intensity exercise

Juliano Marchi Vieira, Jessié Martins Gutierrez, Marília Valvassori Rodrigues,
Fabiano Carvalho Barbosa, Luciane Belmonte Pereira, Fátima Abdalla, Roberta
Schmatz, Andréia Cardoso, Victor Câmara Pimentel, Vera Maria Morsch, Maria Rosa
Chitolina Schetinger, Roselia Maria Spanevello

O manuscrito está formatado de acordo com as normas para publicação da
revista *Brain Research Bulletin*.

Effects of caffeine on the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in brain of rats submitted to high intensity exercise

Juliano Marchi Vieira¹, Jessié Martins Gutierrez¹, Marília Valvassori Rodrigues¹, Fabiano Carvalho Barbosa¹, Luciane Belmonte Pereira¹; Fátima Abdalla¹, Roberta Schmatz¹, Andréia Cardoso¹, Victor Câmera Pimentel¹, Vera Maria Morsch¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger¹, Roselia Maria Spanevello²

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900 - Santa Maria, RS, Brasil.

²Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário- Capão do Leão 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

Corresponding author:

*Roselia Maria Spanevello

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário- Capão do Leão 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

E-mail addresses: rspanevello@gmail.com Phone: +55-53- 39217233

Highlights

High intensity exercise *per se* did not alter NTPDase activity, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities.

Caffeine increased the ectonucleotidase activities in rats submitted to high intensity exercise.

High intensity exercise *per se* reduced AChE activity in synaptosomes from cerebral cortex.

Abbreviates list

ACh – Acetylcholine ATP – Adenosine triphosphate

AChE – Acetylcholinesterase

ADP – Adenosine diphosphate

ADA – Adenosine deaminase

ADO – Adenosine

AMP – Adenosine monophosphate

AT – anaerobic threshold

ATP – Adenosine triphosphate

INO – Inosine

SNC – central nervous system

SNP – Peripheral nervous system

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of caffeine treatment in association with high intensity exercise on the enzymes NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosine deaminase (ADA) and acetylcholinesterase (AChE) in brain of rats. Animals were divided into six groups: I - (Control untrained); II - (untrained plus caffeine 4 mg/kg); III - (untrained plus caffeine 8 mg/kg); IV- (only trained) V- (trained plus caffeine 4 mg/kg) and VI - (trained plus caffeine 8 mg/kg). Swimming was used as a model of intermittent exercise. Animals were trained three times a week, gradually increasing the workload up to 2.5% of the animal's body weight per week. Caffeine was administered by gavage one hour before the training for 5 days a week.- Results showed no alterations in the ATP, ADP, AMP hydrolysis and ADA activity in synaptosomes of cerebral cortex of trained rats (Group IV). However, when trained rats were treated with caffeine we observed a significant increase in the ADP, AMP hydrolysis and ADA activity in synaptosomes of the cerebral cortex (V and VI) when compared to other groups ($P < 0.05$). In relation to the AChE activity, we observed a decrease in the activity of this enzyme in synaptosomes from cerebral cortex in the trained group (IV) and in the animals from the groups V and VI when compared to the control group ($P < 0.05$). Exercise alone did not alter the AChE activity in homogenates from cerebral cortex, striatum, cerebellum or hippocampus (group IV). Group V showed a decrease in the AChE activity in hippocampus and an increase in the activity of this enzyme in striatum and cerebral cortex in relation to control ($P < 0.05$). In the animals from group VI, caffeine increased the AChE activity in cerebral cortex and in cerebellum in relation to other groups ($P < 0.05$). These findings suggest that caffeine modulates the purinergic and cholinergic signaling associated with high intensity exercise.

Key words: ectonucleotidases, acetylcholinesterase, caffeine, intermittent exercise, synaptosome

1. Introduction

Various studies have been showed that regular practice of exercise improves several disease such as Alzheimer, Parkinson and stroke [16, 55]. Physical exercise has been able to avoid damage in brain by inducing cerebral vascularization [43], stimulating the neurogenesis, and improving the learning ability [57]. Also, physical exercise is able to maintain the neuronal plasticity [57] increase the amount of the endogenous neurotrophic factors and improve resistance to brain diseases [15,17]. However, the mechanisms by which physical exercise is able in improving brain functions remains little understood.

Adenine nucleotides (ATP and ADP) and the nucleoside adenosine represent an important class of extracellular molecules for the normal functioning of Central Nervous System (CNS) [12] ATP acts as a fast excitatory neurotransmitter [18] and it is also involved in the neuronal development and plasticity [50]. ATP breakdown product, adenosine, is recognized by its neuromodulatory and neuroprotective actions as well as by the regulation of physiological functions, such as arousal, sleep, anxiety, cognition and memory [52]

The control of extracellular nucleotide and nucleoside concentrations in the CNS is exerted by enzymes, such as NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) [67]. NTPDase is responsible for the hydrolysis of ATP and ADP leading to the formation of AMP [53] Subsequently, AMP is hydrolyzed by action of ecto- 5'-nucleotidase forming adenosine [14]. Ending this chain of reactions, ADA degrades adenosine to inosine [48]. Together, these enzymes constitute a highly refined system for the regulation of nucleotide signaling mediation, pathway control, degradation and nucleoside formation [68].

As a consequence of their key physiological role, ectonucleotidases have been studied in several pathological and experimental conditions [5, 40, 62]. Surprisingly, there are few studies on the effects of exercise on the purinergic signalling. Siqueira et al. (2010) demonstrated that a protocol moderate exercise altered the ectonucleotidase activities in hippocampus of rats, suggesting that the modulation of these enzymes may be related to the neuroprotective effect of the exercise.

Most nerves release ATP as a fast co-transmitter together with classical fast transmitters, such as noradrenaline, glutamate and acetylcholine [1]. After released, acetylcholine is cleaved into choline and acetate by acetylcholinesterase (AChE). AChE is one of the most efficient enzymes, known as rapidly hydrolyzing the neurotransmitter acetylcholine at cholinergic synapses as well as the neuromuscular junction [4, 28]. Besides the catalytic properties, AChE has potent effects on cellular adhesion, neurite extension and postsynaptic differentiation, and has been accepted as the most important biochemical indicator of cholinergic signaling in the CNS [58]. Previous studies have demonstrated that one month of moderate exercise, three times a week, did not alter the AChE activity in cerebral cortex and hippocampus of rats [6]. On the other hand, forced exercise influenced learning and memory with a concomitant increase in the number of cholinergic neurons [3].

Caffeine is the most common drug consumed in the world and occurs naturally in foods and drinks, such as tea, coffee and chocolate. Ergogenic effects of caffeine on athletic performance have been shown in several studies [64]. The ingestion of caffeine improves the performance and endurance during prolonged and exhaustive exercise [59]. Caffeine improves concentration, reduces fatigue and enhances alertness [64]. However, the ergogenic effects of caffeine on the performance in

anaerobic exercises are not clear yet. Several studies have showed a relation of the effect of caffeine in some portions of CNS and some have indicated that adenosine receptor antagonism most likely accounts for the primary mode of action [51].

Considering that there are few studies reporting the model of exercise with the ectonucleotidase and AChE activities in the CNS and that the effects of caffeine are not clear, the main aim of this study was to determine whether chronic intermittent exercise and treatment with caffeine or associated could alter the NTPDase, 5'-nucleotidase, ADA and AChE activities in brain of rats.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Substrates ATP, ADP, AMP, adenosine as well as Trizma base, HEPES, caffeine (1,3,7 trimethylxanthine), Comassie Brilliant Blue G , acetylthiocholine iodide (ASCh) and 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Bovine serum albumin, K₂HPO₄, was obtained from Reagen. All the other chemicals used in this experiment were of the highest purity.

2.2 Animals

Male Wistar rats (90-100 days; 240–280g) from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria were used in this experiment. Animals were maintained at a constant temperature (23±1 °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:

077/2011). All protocols used are based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council) and all efforts were made to minimize the number of animals used in this study and their suffering.

2.3 Experimental exercise protocol

Rats were randomly divided into six groups (n=10 each/group): I - (Control untrained); II - (untrained plus caffeine 4mg/Kg); III - (untrained plus caffeine 8mg/Kg); IV- (only trained) V- (trained plus caffeine 4 mg/Kg) and VI - (trained plus caffeine 8mg/Kg). Swimming was used as a model of intermittent exercise in this experiment.

Firstly, all rats were adapted to water before the beginning of the training. The adaptation was to keep the animals in shallow water (5 cm in depth) at 31 ± 1 °C, 20 min for 5 days. The purpose of the adjustment was the reduction of stress, without, however, promoting adaptations to the training.

The adaptation to the exercise was performed in a 90 cm depth × 115 cm diameter cylindrical tank for 10 days and consists of: day 1: 20 min swimming (without workload); day 2: 20 min swimming only with the “backpacks” (without workload); day 3: 15 min swimming with 3% of body weight; day 4: 20 min swimming with 3% of body weight; day 5: 15 min swimming with 5.5% of body weight; day 6: 20 min swimming with 5.5% of body weight; day 7: 15 min swimming with 8% of workload of body weight, intervals (1 min each) at 5 and 10 min to rest; day 8: 20 min swimming with 8% of workload of body weight, intervals (1 min each) every 5 min to rest; day 9: 15 min swimming with 10.5% of workload of body weight, intervals (1 min each) every 3 min to rest; day 10: 20 min swimming with 10.5% of workload of body weight, intervals (1 min each) every 4 min to rest.

Rats were trained three times a week between 10:00 and 11:00 A.M. with 48 h to rest between trainings. Training occurred in an adapted swimming system with water heated to 31 ± 1 ° C for 6 weeks with a total duration of approximately 12 min/day (25 s exercise/35 s rest). A gradual increase of workload (weight on the back) was used to up to 2.5% for animal's body weight a week. This protocol was developed aiming to train above lactate threshold characterizing anaerobic exercise. Untrained animals were placed in shallow water, at 31 ± 1 °C for 12 min, three times a week, with the goal of being subjected to the same stress without, however, suffering the effects of physical training.

2.4 Treatment with caffeine

Treatment with caffeine started after the period of the adaptation to the exercise. Caffeine was diluted in distilled water (1 mL/kg) and administered by gavage one hour before the training for 5 days a week in the doses of 4 mg/kg (II and V), and in the dose of 8 mg/kg (III and VI). The groups I and IV received only distilled water.

Rats were submitted to a period of six weeks to the protocol exercise and caffeine treatment. At the end of the treatment with caffeine and 48 h after the last exercise session, rats were anesthetized and submitted to euthanasia and the brain was collected for enzyme assays.

2.5 Synaptosome Preparation

The cerebral cortex was homogenized in 10 volumes of an ice cold medium (medium I), consisting of 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM HEPES, pH 7.5, in a motor driven Teflon-glass homogenizer. Synaptosomes were isolated as described by Nagy and Delgado-Escueta (1984) using a discontinuous Percoll gradient (Nagy e Delgado-Escueta, 1984). The pellet was suspended in an isoosmotic solution and the final protein concentration was adjusted to 0.4 - 0.6 mg/mL. Synaptosomes were prepared fresh daily, maintained at 0 - 4 °C throughout the procedure, and used for enzymatic assays.

2.6 Assay of NTPDase and 5'-nucleotidase activities

The NTPDase enzymatic assay of the synaptosomes was carried out in a reaction medium containing 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose and 45 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µl as described in a previous work from our laboratory (Schetinger, Vieira *et al.*, 2001). The 5'-nucleotidase activity was determined essentially by the method of Heymann et al (1984) in a reaction medium containing 10 mM MgSO₄ and 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 µl. The amount of 20 µl of enzyme preparation (8–12 µg of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubated at 37 °C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to obtain a final concentration of 1.0 mM and incubation proceeded for 20 min. For AMP hydrolysis, the 5'-nucleotidase activity was carried out as previously described and the final concentration of the nucleotide AMP added was 2 mM.

Reactions were stopped by the addition of 200 µl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Subsequently, tubes were chilled on ice

for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (1986) using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard (Chan, Delfert *et al.*, 1986). All samples were run in triplicate. Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.7 Assay of adenosine deaminase activity

ADA from cerebral cortex in synaptosomes was determined according to Giusti and Gallanti (1984). Briefly, 50 μL of synaptosomes reacted with 21 $\mu\text{mol/L}$ of adenosine pH 6.5 and was incubated at 37°C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. Results are expressed in units per liter (U/L). One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

2.8 Assay of acetylcholinesterase (AChE) activity

The AChE enzymatic assay in synaptosomes from cerebral cortex and homogenates of brain regions (cerebral cortex, striatum, hippocampus and cerebellum) was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961) as previously described by Rocha et al. (1993) (Ellman, Courtney *et al.*, 1961; Rocha, Emanuelli *et al.*, 1993). The reaction mixture (2 ml final volume) was composed of 50 mM K^+ -phosphate buffer, pH 7.5 and 1mM of DTNB. The method is based on the formation of the yellow anion, 4,4'- dithio-bis-acid-nitrobenzoic measured by absorbance at 412 nm for 2 min incubation at 25°C. The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylcholine iodide. All samples were run in

duplicate or triplicate and enzyme activity was expressed in micromoles AcSCh/h/mg of protein.

2.9 Lactate determination

The blood lactate concentration has been measured by the Accutrend Plus - Roche® portable lactate analyzers. A drop of no less than 25-50 µl of blood is applied to the strip (accusport BM-lactate), and 60 s later the lactate concentration is read off. We have in accordance with the manufacturer's instructions checked the on the under side of each strip after the analyses and examined the coloring; if uneven, the analysis was rejected. Was used 25–50 µl of blood for each analysis. Blood was added to the strip by letting it drip from a distal tail.

2.10 Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard [8].

2.11 Statistical analysis

Data are presented as mean±SEM and were analyzed statistically by two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-tests (Graphpad – Prism 5.0). Differences between groups were considered to be significant when $P<0.05$.

3. Results

The effect of the exercise alone or in association with caffeine treatment in the NTPDase and 5'- nucleotidase activities is shown in Figures 1 and 2. As can be

observed, exercise alone did not alter the ATP, ADP and AMP hydrolysis in synaptosomes of cerebral cortex (Figure 1 A, B and Figure 2). However, when rats submitted to the exercise protocol were treated with caffeine in the dosage of the 4 mg/kg and 8 mg/kg, we observed a significant increase in the ADP and AMP hydrolysis when compared with other groups ($P < 0.05$) (Figures 1B and 2). In addition, the treatment with caffeine alone did not alter the hydrolysis of ADP and AMP, but the ATP hydrolysis was significantly decreased in the animals treated with caffeine 4 mg/kg ($P < 0.05$) (Figure 1A).

Similarly, no alterations were observed in the ADA activity in synaptosomes from cerebral cortex of rats submitted only to the protocol of intermittent high intensity exercise (Figure 3). On the other hand, animals submitted to exercise and treated with caffeine in the dosage of 4 and 8 mg/kg showed a significant increase in the activity of this enzyme ($P < 0.05$) in relation to other groups (Figure 3). Caffeine alone did not alter the ADA activity in synaptosomes from cerebral cortex of rats in the dosage used in this study (Figure 3).

Figure 4 shows the effect of the exercise alone or in association with caffeine treatment in the AChE activity in synaptosomes from cerebral cortex. The AChE activity was decreased in the trained group as well as in the groups trained and treated with 4 and 8 mg/kg of caffeine when compared with the control group ($P < 0.001$) (Figure 4). Only caffeine did not alter significantly the AChE activity in synaptosomes from cerebral cortex of rats in this study (Figure 4).

In this study we also evaluated the effects of the high intensity exercise associated with caffeine treatment in the AChE activity in homogenates from brain regions such as cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum. As can be

observed in Table I, exercise alone did not alter the AChE activity in any brain structure evaluated (Table I, group IV). When rats submitted to exercise protocol were treated with caffeine in the dosage of 4 mg/Kg, we observed a decrease in the AChE activity in hippocampus and an increase in the activity of this enzyme in striatum and cerebral cortex when compared with control group ($P<0.05$) (Table I, group V). Treatment with 8 mg/Kg of caffeine increased the AChE activity in cerebral cortex and in cerebellum in the animals submitted to exercise protocol in relation to the control group ($P<0.05$).) (Table I, group VI). Treatment of untrained rats with caffeine (04mg/kg) resulted in an increased AChE activity in the cerebral cortex and striatum and a decrease in this enzyme activity in hippocampus in relation to the control groups (Table I, group II) ($P<0.05$). In addition, caffeine *per se* (08mg/kg) only increased the AChE activity in cerebellum (Table I, group III) ($P<0.05$).

4. Discussion

There are in numerous types of exercise varying in models (types), volume (duration, frequency and sets, repetitions) and intensity (loads, speed). Aerobic exercise is mainly characterized by low-intensity and long-duration, while anaerobic exercise is characterized by high-intensity and short-duration. Many studies have investigated the beneficial effects of both aerobic and anaerobic exercises [7, 15, 31, 38, 41, 44, 47, 57, 63, 65, 66, 69].

Data from literature have showed that exercise (mainly moderate) prevents or delays damage in health chronic diseases such as Alzheimer's, Parkinson's and Stroke [15, 29]. However, it has showed that anaerobic exercise can be an alternative the aerobic training because it provokes similar gains and/or superior adaptations in less time, when compared with aerobic exercise [29, 63]. Anaerobic exercise

provokes adaptations in markers of skeletal muscle such as increased consumption of fat acids, reduced use of glycogen, low lactate production during exercise recovery, improved cardiovascular adaptations and peripheral vascular structure, as well as increased maximal oxygen uptake [10, 11, 30, 63]. However, the molecular mechanism by which the anaerobic exercise alters brain functions is still unclear. Surprisingly, there are few studies on the effects of the aerobic or anaerobic exercises on purinergic and cholinergic signaling in the CNS.

In the present study we investigated the influence of the high intensity exercise in adenine nucleotide hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex of rats. Firstly, we demonstrated that high intensity exercise alone was unable to affect the NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activities. Different findings were obtained by Ben et al. (2009), who demonstrated that when animals were submitted to one month of exercise training, three times per week, ADP and AMP hydrolysis were decreased in cerebral cortex synaptosomes [6]. Siqueira et al. (2010) also showed that neuroprotective exercise protocol (20 min of daily training in treadmill for 2 weeks) diminished significantly the ADP hydrolysis, trending to reduce ATP hydrolysis in both hippocampal synaptosomes and blood serum of rats [60]. Taken together, these findings suggest that ectonucleotidase activities in CNS may be modulated differently according to the type, time and intensity of the exercise.

On the other hand, when rats submitted to exercise protocol were treated with caffeine in the dosage of 4 and 8 mg/Kg, we observed a significant increase in the NTPDase activity (for ADP substrate), 5'- nucleotidase and ADA (Figure 1B, 2 and 3) in synaptosomes from cerebral cortex. Previous studies have also demonstrated that the acute administration alone of caffeine (30 mg/kg, i.p) produced an decreased of ATP and ADP hydrolysis in synaptosomes of hippocampus and striatum. However,

the administration of caffeine at doses of 0.3 and 1g/L (drink water), after 14 days of treatment, did not affect nucleotide hydrolysis in rats [19]. In our study caffeine per se did not alter the ADP, AMP and adenosine hydrolysis, but caffeine at doses 4 and 8 mg/kg associated with high intensity exercise protocol increased the ectonucleotidase activities in the synaptic cleft.

Caffeine is a CNS stimulant that easily crosses the blood brain barrier. This compound has been used in athletic competitions primarily due to its ergogenic effects [20, 23, 34, 36]. The effective dosage of caffeine, without apparent adverse effects, ranges from 3 to 9 mg/kg. At this range, caffeine has been shown to delay fatigue during prolonged intense exercise [23, 35, 59]. Three main cellular mechanisms have been proposed to explain the ergogenic potential of caffeine during exercise: (a) increased myofilament affinity for calcium and/or increased release of calcium from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle; (b) cellular actions caused by the accumulation of cyclic - 3',5'- adenosine monophosphate (cAMP) in various tissues including skeletal muscle and adipocytes; and (c) cellular actions mediated by competitive inhibition of adenosine receptors in the CNS. The relative importance of each of the above mechanisms continues to be debated. However, growing evidence suggests that the inhibition of adenosine receptors is one of the most important to explain the physiological effects of caffeine.

Adenosine concentrations in the CNS are mainly regulated by ATP metabolism. ATP is released to the synaptic cleft in a calcium-dependent manner, where it can act as a fast neurotransmitter [50]. After the ATP release at the synapse, it undergoes rapid enzymatic degradation by ectonucleotidases such as NTPDase and 5'-nucleotidase [67]. The final product of this enzyme cascade is the nucleoside

adenosine, which subsequently can be directly inactivated through the ADA action [67].

Adenosine acts on G-protein-coupled receptors, namely, A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃, and is considered an important neuromodulator responsible for controlling the release of several neurotransmitters including serotonin, noroepinephrine, dopamine, GABA, glutamate and acetylcholine [9, 24]. The biochemical mechanism that underlies the effects of caffeine is the blockade of adenosine A₁ and A_{2A} receptors [33]. This effect could impair the neuromodulatory actions of adenosine leading to the increase of neurotransmitter release. Literature suggests that the blockade of adenosine receptors by caffeine seems to be the most likely mechanism of CNS stimulation and delayed fatigue during exercise [23]. This theory is based on the observations that adenosine inhibits the release of most brain excitatory transmitters, particularly dopamine [23]. Decreases in dopamine, along with the increases in serotonin levels have been linked to central fatigue during exercise [21,22].

Considering that ectonucleotidase pathway has been postulated to be the main source of adenosine at the synaptic levels, in this study we demonstrated that caffeine treatment when associated with high intensity exercise play a modulatory role in the NTPDase, 5'- nucleotidase and ADA activities, indirectly modulating the availability of adenine nucleotides and adenosine levels in the synaptic levels. An important aspect to be discussed here is that previous studies have demonstrated that the antagonist of adenosine A₁ receptors increase extracellular adenosine levels and that caffeine increase the A₁ receptor expression [2]. In this line, alterations in the activity of these enzymes in the synaptosomes may be a compensatory

mechanism to decrease the adenosine levels and counteract the antagonist actions of caffeine.

In this study we also evaluated the effects of the high intensity exercise and caffeine treatment in the AChE activity. Results have demonstrated that in animals submitted to anaerobic exercise protocol the AChE activity was decreased in synaptosomes from cerebral cortex (Figure 4). On the other hand, the exercise per se did not alter the AChE activity in supernatant (S1) from brain regions such as cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum (Table I). This difference between synaptosome and S1 could be explained by the existence of both G4 (membrane bound) and G1 (cytosolic) AChE molecular forms in the different brain regions (Das et al., 2001). There is result suggests that G4 AChE molecular form may be more sensitive to the effects of high intensity exercise than G1 AChE molecular form. In fact, several studies have evaluated the effects of exercise in the activity and regulation of G4 AChE in muscle [26,27,32].

AChE belongs to the serine hydrolase family and is one of the key functional proteins in the CNS. It is responsible for the fast hydrolysis of acetylcholine after binding to the postsynaptic receptors [45]. The AChE activity measured in the CNS has been extensively studied because of its involvement in the cholinergic neurotransmission [58, 61], the deleterious consequences of its inhibition [42] and its therapeutic effect on neurodegenerative diseases [49]. We still do not know the exact underlying mechanism through which AChE activity in synaptosome is modified after exercise; however, we can suggest that the high intensity exercise may affect brain cholinergic mechanisms since the reduction in the AChE activity provoked a

decrease in the acetylcholine hydrolysis increasing the cholinergic activity in the CNS.

An interesting finding of the present work is that caffeine not reverted the inhibition in the AChE activity in synaptosomes from cerebral cortex induced by exercise (Figure 4). Moreover, caffeine under the same conditions altered the AChE activity in cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum S1, but these alterations were not homogeneous in all evaluated brain structures. In the hippocampus, caffeine at 4mg/kg alone or associated with exercise inhibit the AChE activity. Others studies have also demonstrated that caffeine inhibits the AChE activity [37], however, this alterations observed in our study can also be associated at least in part by the regulation of acetylcholine release via adenosine A1 receptor. Previous studies demonstrated that the oral administration of selective adenosine A1 receptor antagonist (8-dicyclopropylmethyl, 1-3- dipropylxantine) increased the extracellular level of acetylcholine in rat cerebral cortex [39]. In brain, A1 receptor was reported to be found predominantly in the hippocampus and the cerebral cortex, regions, where in our study caffeine treatment decreased the AChE activity. The cholinergic system is well known to be involved in the learning and memory process. Thus, the stimulation of acetylcholine release and inhibition of AChE could be one of the important mechanisms of cognitive memory related to caffeine administration. On the other hand, in cortex cerebral, striatum and cerebellum S1 was observed an increased in the AChE activity induced by caffeine treatment alone or associated to exercise. These alterations may be a compensatory mechanism to decrease the acetylcholine levels induced by antagonist actions of caffeine in the adenosine A1 receptors.

In conclusion, we demonstrated that high intensity protocol exercise did not alter the ectonucleotidase activities in synaptosomes from cerebral cortex and acetylcholinesterase in brain regions. Caffeine associated with exercise plays a modulator role on ectonucleotidase and AChE activities in the CNS. Studies about the effects of high intensity exercise in the CNS are still scarce and it is clear that further studies are required before a complete understanding.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq, FAPERGS, CAPES, Federal University of Santa Maria and FINEP-IBNET and INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection.

References

- [1] M.P. Abbracchio, G. Burnstock, A. Verkhratsky, H. Zimmermann, Purinergic signalling in the nervous system: an overview, *Trends Neurosci*, 32 (2009) 19-29.
- [2] B.T. Andresen, D.G. Gillespie, Z. Mi, R.K. Dubey, E.K. Jackson, Role of adenosine A(1) receptors in modulating extracellular adenosine levels, *J Pharmacol Exp Ther*, 291 (1999) 76-80.
- [3] E.T. Ang, G.S. Dawe, P.T. Wong, S. Moochhala, Y.K. Ng, Alterations in spatial learning and memory after forced exercise, *Brain Res*, 1113 (2006) 186-193.
- [4] L. Anglister, A. Etlin, E. Finkel, A.R. Durrant, A. Lev-Tov, Cholinesterases in development and disease, *Chem Biol Interact*, 175 (2008) 92-100.

- [5] M.D. Bagatini, C.C. Martins, D. Gasparetto, R.M. Spanevello, L.V. Becker, C.S. Rosa, V. Battisti, L. Belle, J.F. Goncalves, M.R. Schetinger, R.B. Dos Santos, L.Z. Oliveira, V.M. Morsch, Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease, *Clin Chim Acta*, 412 (2011) 159-164.
- [6] J. Ben, F.M. Soares, F. Cechetti, F.C. Vuaden, C.D. Bonan, C.A. Netto, A.T. Wyse, Exercise effects on activities of Na(+),K(+)-ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats, *Brain Res*, 1302 (2009) 248-255.
- [7] N.C. Berchtold, J.P. Kesslak, C.W. Cotman, Hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene regulation by exercise and the medial septum, *J Neurosci Res*, 68 (2002) 511-521.
- [8] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72 (1976) 248-254.
- [9] J.M. Brundage, T.V. Dunwiddie, Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system, *Adv Pharmacol*, 39 (1997) 353-391.
- [10] K.A. Burgomaster, K.R. Howarth, S.M. Phillips, M. Rakobowchuk, M.J. Macdonald, S.L. McGee, M.J. Gibala, Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans, *J Physiol*, 586 (2008) 151-160.
- [11] K.A. Burgomaster, S.C. Hughes, G.J. Heigenhauser, S.N. Bradwell, M.J. Gibala, Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans, *J Appl Physiol*, 98 (2005) 1985-1990.
- [12] G. Burnstock, Purinergic signalling, *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1 (2006) S172-181.
- [13] K.M. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca²⁺ - stimulated ATPase activity, *Anal Biochem*, 157 (1986) 375-380.

- [14] S.P. Colgan, H.K. Eltzschig, T. Eckle, L.F. Thompson, Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73), *Purinergic Signal*, 2 (2006) 351-360.
- [15] C.W. Cotman, N.C. Berchtold, Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity, *Trends Neurosci*, 25 (2002) 295-301.
- [16] C.W. Cotman, N.C. Berchtold, Physical activity and the maintenance of cognition: learning from animal models, *Alzheimers Dement*, 3 (2007) S30-37.
- [17] C.W. Cotman, W.W. Poon, R.A. Rissman, M. Blurton-Jones, The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology, *J Neuropathol Exp Neurol*, 64 (2005) 104-112.
- [18] R.A. Cunha, A.M. Sebastiao, J.A. Ribeiro, Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors, *J Neurosci*, 18 (1998) 1987-1995.
- [19] R.S. da Silva, A.N. Bruno, A.M. Battastini, J.J. Sarkis, D.R. Lara, C.D. Bonan, Acute caffeine treatment increases extracellular nucleotide hydrolysis from rat striatal and hippocampal synaptosomes, *Neurochem Res*, 28 (2003) 1249-1254.
- [20] J.K. Davis, J.M. Green, Caffeine and anaerobic performance: ergogenic value and mechanisms of action, *Sports Med*, 39 (2009) 813-832.
- [21] J.M. Davis, S.P. Bailey, Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise, *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 29 (1997) 45-57.
- [22] J.M. Davis, R.S. Welsh, N.A. Alerson, Effects of carbohydrate and chromium ingestion during intermittent high-intensity exercise to fatigue, *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 10 (2000) 476-485.

- [23] J.M. Davis, Z. Zhao, H.S. Stock, K.A. Mehl, J. Buggy, G.A. Hand, Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284 (2003) R399-404.
- [24] P. Di Iorio, P. Ballerini, F. Caciagli, R. Ciccarelli, Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue, *Pharmacol Res*, 37 (1998) 169-178.
- [25] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, Jr., R.M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol*, 7 (1961) 88-95.
- [26] H.L. Fernandez, J.A. Donoso, Exercise selectively increases G4 AChE activity in fast-twitch muscle, *J Appl Physiol*, 65 (1988) 2245-2252.
- [27] H.L. Fernandez, C.A. Hodges-Savola, Physiological regulation of G4 AChE in fast-twitch muscle: effects of exercise and CGRP, *J Appl Physiol*, 80 (1996) 357-362.
- [28] R. Gaspersic, B. Koritnik, N. Crne-Finderle, J. Sketelj, Acetylcholinesterase in the neuromuscular junction, *Chem Biol Interact*, 119-120 (1999) 301-308.
- [29] M.J. Gibala, J.P. Little, M.J. Macdonald, J.A. Hawley, Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease, *J Physiol*, (2012).
- [30] M.J. Gibala, J.P. Little, M. van Essen, G.P. Wilkin, K.A. Burgomaster, A. Safdar, S. Raha, M.A. Tarnopolsky, Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance, *J Physiol*, 575 (2006) 901-911.
- [31] V.T. Giesel, M. Reche, L. Schneider, L.C. Araujo, R. Scalco, H. von Eye Corleta, E. Capp, Effects of intermittent high-intensity exercise and carbohydrate supplementation on IGF-1 and glycogen of Wistar rats, *Growth Horm IGF Res*, 19 (2009) 156-161.

- [32] V. Gisiger, M. Belisle, P.F. Gardiner, Acetylcholinesterase adaptation to voluntary wheel running is proportional to the volume of activity in fast, but not slow, rat hindlimb muscles, *Eur J Neurosci*, 6 (1994) 673-680.
- [33] C.V. Gomes, M.P. Kaster, A.R. Tome, P.M. Agostinho, R.A. Cunha, Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration, *Biochim Biophys Acta*, 1808 (2011) 1380-1399.
- [34] T.E. Graham, Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance, *Sports Med*, 31 (2001) 785-807.
- [35] H.E. GRAHAM TE, SATHASIVAN P, Metabolic and endurance exercise effects of coffee and caffeine ingestion, *J Appl Physiol*, 85 (1998) 883-889.
- [36] T.E. Graham, L.L. Spriet, Performance and metabolic responses to a high caffeine dose during prolonged exercise, *J Appl Physiol*, 71 (1991) 2292-2298.
- [37] N. Karadsheh, P. Kussie, D.S. Linthicum, Inhibition of acetylcholinesterase by caffeine, anabasine, methyl pyrrolidine and their derivatives, *Toxicol Lett*, 55 (1991) 335-342.
- [38] K. Kawanaka, I. Tabata, A. Tanaka, M. Higuchi, Effects of high-intensity intermittent swimming on glucose transport in rat epitrochlearis muscle, *J Appl Physiol*, 84 (1998) 1852-1857.
- [39] M. Kurokawa, S. Shiozaki, H. Nonaka, H. Kase, J. Nakamura, Y. Kuwana, In vivo regulation of acetylcholine release via adenosine A1 receptor in rat cerebral cortex, *Neurosci Lett*, 209 (1996) 181-184.
- [40] D.B. Leal, C.A. Streher, M. Bertoncheli Cde, L.F. Carli, C.A. Leal, J.E. da Silva, V.M. Morsch, M.R. Schetinger, HIV infection is associated with increased NTPDase

activity that correlates with CD39-positive lymphocytes, *Biochim Biophys Acta*, 1746 (2005) 129-134.

[41] J.P. Little, A. Safdar, D. Bishop, M.A. Tarnopolsky, M.J. Gibala, An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1 α and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300 (2011) R1303-1310.

[42] M. Lotti, Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation, *Clin Chem*, 41 (1995) 1814-1818.

[43] M.P. Mattson, Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run, *Brain Res*, 886 (2000) 47-53.

[44] L. Mazzardo-Martins, D.F. Martins, R. Marcon, U.D. Dos Santos, B. Speckhann, V.M. Gadotti, A.R. Sigwalt, L.G. Guglielmo, A.R. Santos, High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system, *J Pain*, 11 (2010) 1384-1393.

[45] M.M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, A. Levey, E.G. Duysen, O. Lockridge, Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine, *Neuroscience*, 110 (2002) 627-639.

[46] A. Nagy, A.V. Delgado-Escueta, Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll), *J Neurochem*, 43 (1984) 1114-1123.

[47] H.S. Oliff, N.C. Berchtold, P. Isackson, C.W. Cotman, Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus, *Brain Res Mol Brain Res*, 61 (1998) 147-153.

[48] C.A. Pritsos, Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system, *Chem Biol Interact*, 129 (2000) 195-208.

- [49] Z. Rakonczay, Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain, *Acta Biol Hung*, 54 (2003) 183-189.
- [50] M.P. Rathbone, P.J. Middlemiss, J.W. Gysbers, C. Andrew, M.A. Herman, J.K. Reed, R. Ciccarelli, P. Di Iorio, F. Caciagli, Trophic effects of purines in neurons and glial cells, *Prog Neurobiol*, 59 (1999) 663-690.
- [51] J.A. Ribeiro, A.M. Sebastiao, Caffeine and adenosine, *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 1 (2010) S3-15.
- [52] J.A. Ribeiro, A.M. Sebastiao, A. de Mendonca, Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications, *Prog Neurobiol*, 68 (2002) 377-392.
- [53] S.C. Robson, J. Sevigny, H. Zimmermann, The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance, *Purinergic Signal*, 2 (2006) 409-430.
- [54] J.B. Rocha, T. Emanuelli, M.E. Pereira, Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats, *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 53 (1993) 431-437.
- [55] A. Rosso, J. Mossey, C.F. Lippa, Caffeine: neuroprotective functions in cognition and Alzheimer's disease, *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 23 (2008) 417-422.
- [56] M.R. Schetinger, V.L. Vieira, V.M. Morsch, D. Balz, ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 128 (2001) 731-741.
- [57] H. Shen, L. Tong, R. Balazs, C.W. Cotman, Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus, *Neuroscience*, 107 (2001) 219-229.
- [58] I. Silman, J.L. Sussman, Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology, *Curr Opin Pharmacol*, 5 (2005) 293-302.

- [59] M.J. Simmonds, C.L. Minahan, S. Sabapathy, Caffeine improves supramaximal cycling but not the rate of anaerobic energy release, *Eur J Appl Physiol*, 109 (2010) 287-295.
- [60] I.R. Siqueira, V.R. Elsner, L.S. Rilho, M.G. Bahlis, K. Bertoldi, J.R. Rozisky, A.M. Batastini, I.L. Torres, A neuroprotective exercise protocol reduces the adenine nucleotide hydrolysis in hippocampal synaptosomes and serum of rats, *Brain Res*, 1316 (2010) 173-180.
- [61] H. Soreq, S. Seidman, Acetylcholinesterase--new roles for an old actor, *Nat Rev Neurosci*, 2 (2001) 294-302.
- [62] R.M. Spanevello, C.M. Mazzanti, R. Schmatz, G. Thome, M. Bagatini, M. Correa, C. Rosa, N. Stefanello, L.P. Belle, M.B. Moretto, L. Oliveira, V.M. Morsch, M.R. Schetinger, The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients, *Clin Chim Acta*, 411 (2010) 210-214.
- [63] I. Tabata, K. Nishimura, M. Kouzaki, Y. Hirai, F. Ogita, M. Miyachi, K. Yamamoto, Effects of moderate-intensity endurance and high-intensity intermittent training on anaerobic capacity and VO₂max, *Med Sci Sports Exerc*, 28 (1996) 1327-1330.
- [64] M.A. Tarnopolsky, Effect of caffeine on the neuromuscular system--potential as an ergogenic aid, *Appl Physiol Nutr Metab*, 33 (2008) 1284-1289.
- [65] S. Terada, K. Kawanaka, M. Goto, T. Shimokawa, I. Tabata, Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1 α protein expression in rat skeletal muscle, *Acta Physiol Scand*, 184 (2005) 59-65.
- [66] S. Terada, T. Yokozeki, K. Kawanaka, K. Ogawa, M. Higuchi, O. Ezaki, I. Tabata, Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle, *J Appl Physiol*, 90 (2001) 2019-2024
- [67] G.G. Yegutkin, Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade, *Biochim Biophys Acta*, 1783 (2008) 673-694.

[68] G.G. Yegutkin, S.S. Samburski, S. Jalkanen, I. Novak, ATP-consuming and ATP-generating enzymes secreted by pancreas, *J Biol Chem*, 281 (2006) 29441-29447.

[69] E. Ziemann, T. Grzywacz, M. Luszczuk, R. Laskowski, R.A. Olek, A.L. Gibson, Aerobic and anaerobic changes with high-intensity interval training in active college-aged men, *J Strength Cond Res*, 25 (2011) 1104-1112.

TABLE I – Lactate rats untrained and trained.

Rats	Baseline	4,5%	6,5%	8,5%	10,5%
Trained	3,64 ±0,22	4,94 ± 0,49	5,280±0,42	6,320±0,38	7,880 ± 0,6
Untrained	4,10 ± 0,4	5,96 ± 0,17	6,93 ± 0,08	8,03 ± 0,21	9,55 ± 0,55

TABLE II – AChE activities from brain regions of rats submitted to high intensity exercise and treated with caffeine. Groups I - (Control untrained); II - (untrained plus caffeine 4 mg/kg); III - (untrained plus caffeine 8 mg/kg); IV- (only trained) V- (trained plus caffeine 4 mg/Kg) and VI - (trained plus caffeine 8 mg/kg). Values represent mean ± SEM. *Different from the others in the same column (P<0.05).

Groups	AChE (AcsCh/h/mg of protein)		AChE (AcsCh/h/mg of protein)	
	Cerebral cortex	Hippocampus	Striatum	Cerebellum
I	2.77 ± 0.29	4.82 ± 0.40	6.99 ± 2.10	0.44 ± 0.11
II	3.75 ± 0.29*	3.39 ± 0.43*	10.35 ± 1.7*	0.75 ± 0.10
III	3.20 ± 0.39	4.35 ± 1.71	9.63 ± 2.95	2.40 ± 0.76*
IV	3.01 ± 0.55	4.22 ± 1.05	9.52 ± 1.24	0.39 ± 0.10
V	4.52 ± 0.94*	3.68 ± 0.39*	12.68 ± 4.0*	0.70 ± 0.13
VI	4.20 ± 0.69*	3.93 ± 0.43	8.72 ± 2.05	1.48 ± 0.18*

Figures Legends

Figure 1 – Effects of the treatment with caffeine (4 mg/kg and 8 mg/kg) alone or associated with high intensity exercise on the NTPDase activity in the synaptosomes from cerebral cortex of rats using ATP (A) and ADP (B) as substrate. Data are presented as mean \pm SEM, Two-way ANOVA. Groups are statistically different (*) for $P < 0.05$, $n = 06$ to each group.

Figure 2 – Effects of the treatment with caffeine (4 mg/kg and 8 mg/kg) alone or associated with high intensity exercise on the 5'-nucleotidase activity in the synaptosomes from cerebral cortex of rats using AMP as substrate. Data are presented as mean \pm SEM, Two-way ANOVA. Groups are statistically different (*) for $P < 0.05$, $n = 06$ to each group.

Figure 3 – Effects of the treatment with caffeine (4 mg/kg and 8 mg/kg) alone or associated with high intensity exercise on the adenosine deaminase activity in the synaptosomes from cerebral cortex of rats. Data are presented as mean \pm SEM, Two-way ANOVA. Groups are statistically different (*) for $P < 0.05$, $n = 06$ to each group.

Figure 4 – The effects of the treatment with caffeine (4 mg/kg and 8 mg/kg) alone or associated with high intensity exercise on the acetylcholinesterase activity in the synaptosomes from cerebral cortex of rats. Data are presented as mean \pm SEM, Two-way ANOVA. Groups are statistically different (*) for $P < 0.0001$, $n = 06$ to each group.

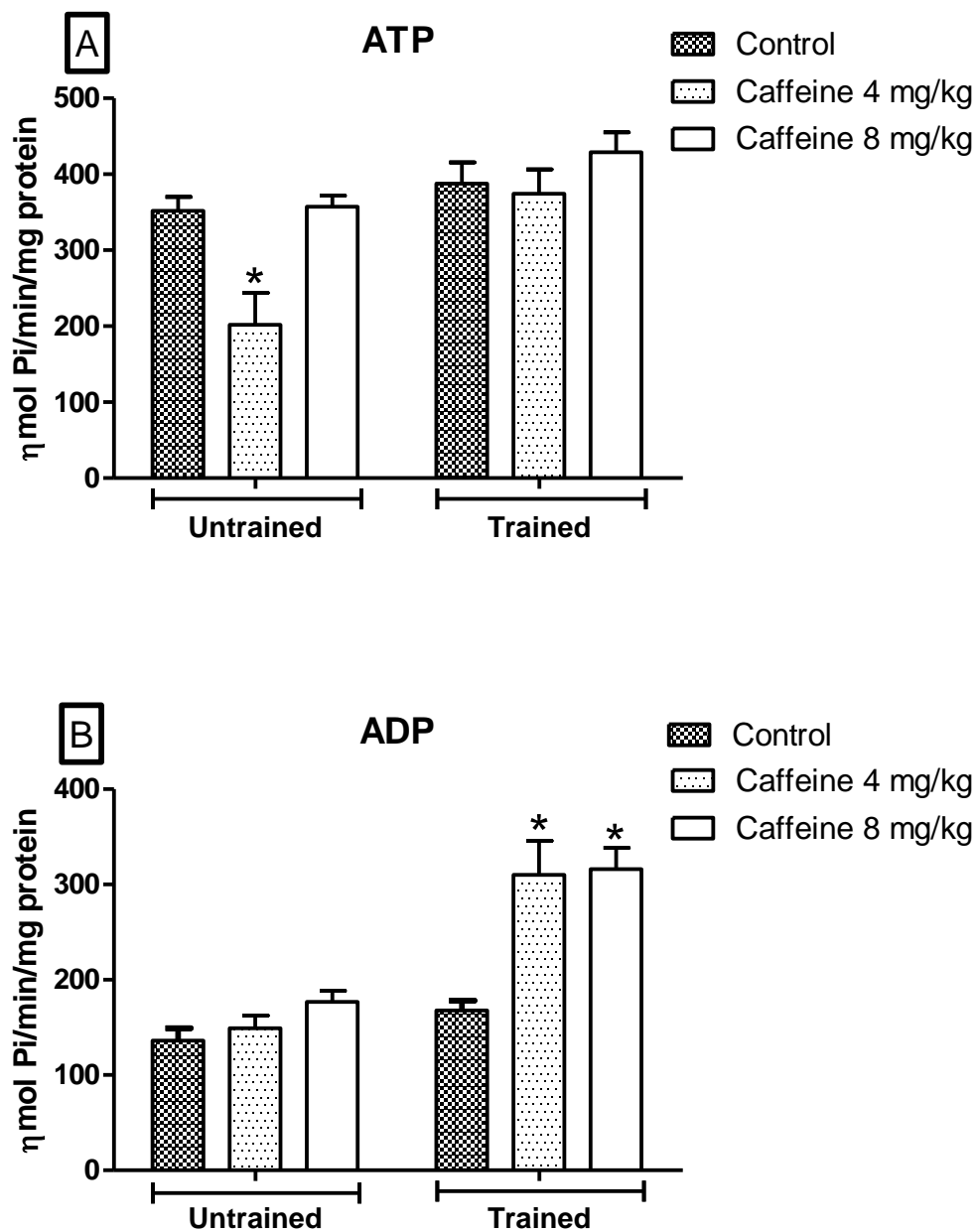


Figure 1

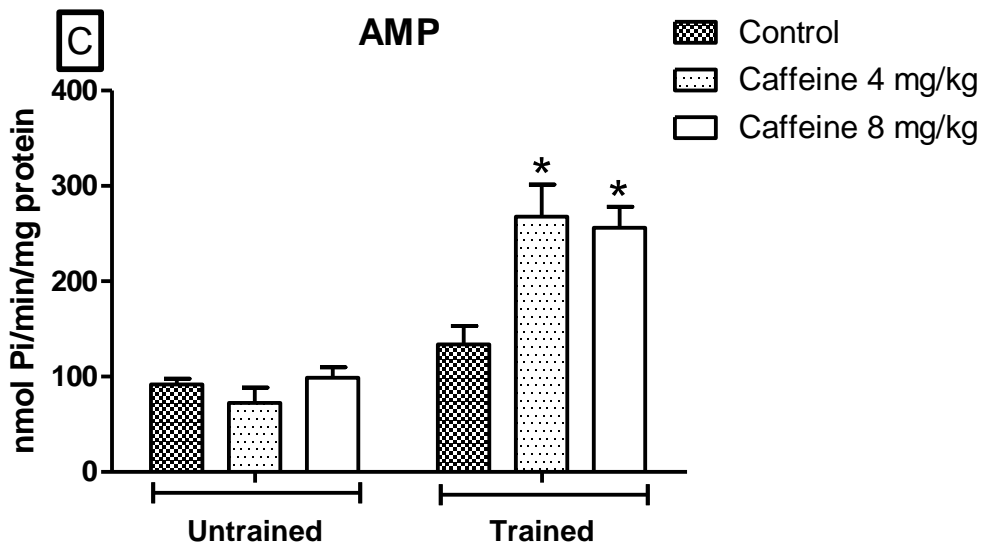


Figure 2

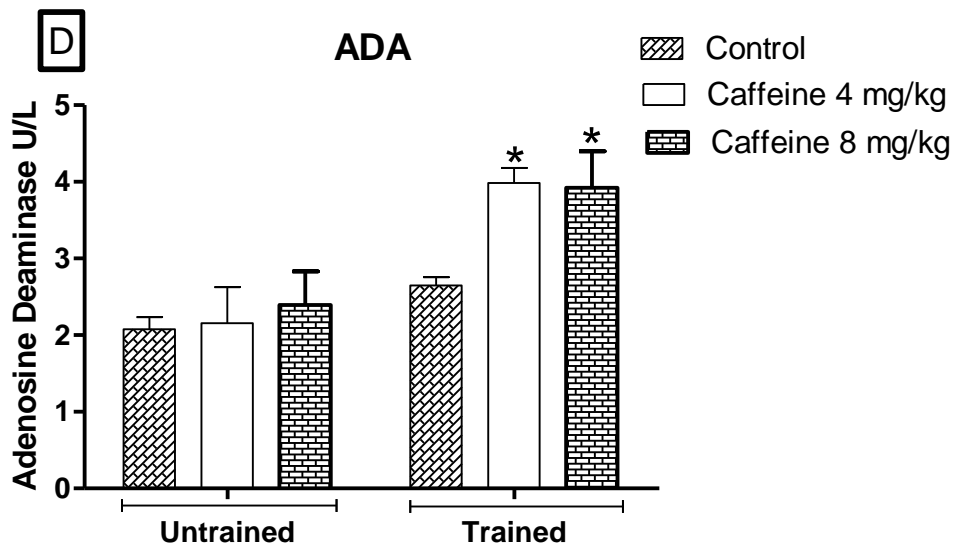


Figure 3

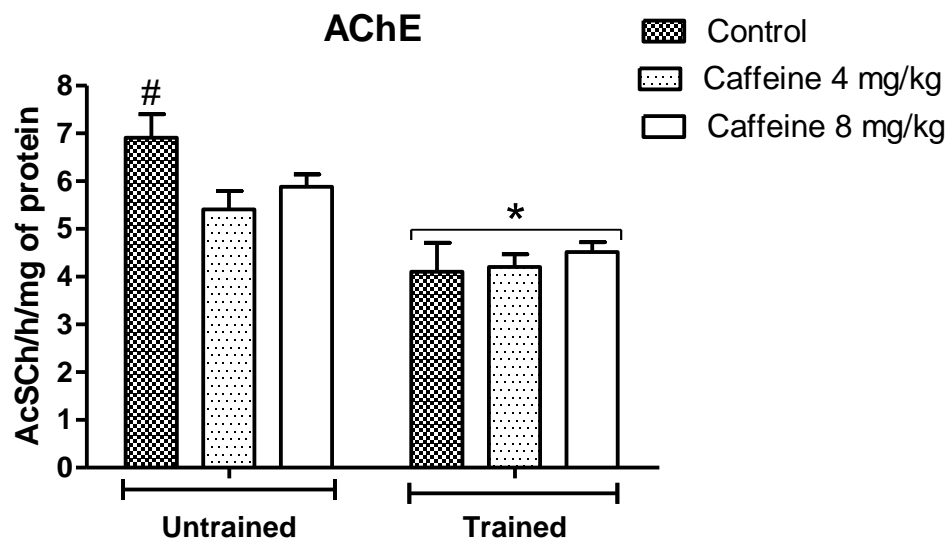


Figure 4

4. CONCLUSÕES

1. O exercício de alta intensidade não alterou a atividade da NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina desaminase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos, sugerindo que esse protocolo de exercício não afeta a sinalização purinérgica em SNC.
2. Quando ratos submetidos ao protocolo de exercício de alta intensidade foram tratados com cafeína, houve um aumento na atividade da NTPDase (para a hidrólise do ADP) da 5'-nucleotidase e da adenosina deaminase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Essa modulação na atividade das ectonucleotidases pode ser vista com um mecanismo compensatório para alterar os níveis extracelulares de adenosina, uma vez que a cafeína é um antagonista dos receptores A₁ de adenosina.
3. A atividade da acetilcolinesterase foi diminuída em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos submetidos ao protocolo de exercício de alta intensidade sendo que o tratamento com cafeína nas doses de 4 e 8 mg/kg não foi capaz de reverter essa inibição. Esses resultados sugerem que esse tipo de exercício pode alterar principalmente isoformas da AChE ligadas a membrana, podendo assim afetar a neurotransmissão colinérgica no SNC.
4. Em homogeneizado de córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo o protocolo de exercício não afetou a atividade da acetilcolinesterase. Entretanto o tratamento com cafeína na dose de 4 mg/kg per se ou associado ao exercício inibiu a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo. Essa inibição na atividade da enzima pela cafeína pode levar a um aumento nos níveis do neurotransmissor acetilcolina. Esse achado poderia explicar ao menos em parte a melhora memória e outras funções cognitivas associadas ao tratamento com essa metilxantina.

5. Um aumento na atividade da acetilcolinesterase foi observado em homogeneizado de córtex cerebral, estriado e cerebelo após tratamento com cafeína *per se* ou associado ao exercício. Esse aumento na atividade dessa enzima pode ser um mecanismo regulatório para diminuir os níveis de acetilcolina, uma vez que tem sido relatado que antagonistas dos receptores de adenosina, como é o caso da cafeína, podem aumentar a liberação do neurotransmissor acetilcolina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbracchio, M. P., G. Burnstock, *et al.* Purinergic signalling in the nervous system: an overview. Trends Neurosci, v.32, n.1, Jan, p.19-29. 2009.

Abreu, R. V., E. M. Silva-Oliveira, *et al.* Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. Pharmacol Biochem Behav, v.99, n.4, Oct, p.659-64. 2011.

Acosta Maldonado, P., M. De Carvalho Correa, *et al.* Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. Clin Biochem, v.41, n.6, Apr, p.400-6. 2008.

Andine, P., K. A. Rudolphi, *et al.* Effect of propentofylline (HWA 285) on extracellular purines and excitatory amino acids in CA1 of rat hippocampus during transient ischaemia. Br J Pharmacol, v.100, n.4, Aug, p.814-8. 1990.

Andresen, B. T., D. G. Gillespie, *et al.* Role of adenosine A(1) receptors in modulating extracellular adenosine levels. J Pharmacol Exp Ther, v.291, n.1, Oct, p.76-80. 1999.

Ang, E. T., G. S. Dawe, *et al.* Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. Brain Res, v.1113, n.1, Oct 3, p.186-93. 2006.

Anglister, L., A. Etlin, *et al.* Cholinesterases in development and disease. Chem Biol Interact, v.175, n.1-3, Sep 25, p.92-100. 2008.

Armstrong, N., G. Tomkinson, *et al.* Aerobic fitness and its relationship to sport, exercise training and habitual physical activity during youth. Br J Sports Med, v.45, n.11, Sep, p.849-58. 2011.

Arnaud, M. J. Nutrition discussion forum. Br J Nutr, v.95, n.3, Mar, p.650-3; discussion 654-6. 2006.

Bagatini, M. D., C. C. Martins, *et al.* Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. Clin Chim Acta, v.412, n.1-2, Jan 14, p.159-64. 2011.

Barstow, T. J. Characterization of VO₂ kinetics during heavy exercise. Med Sci Sports Exerc, v.26, n.11, Nov, p.1327-34. 1994.

Ben, J., F. M. Soares, *et al.* Exercise effects on activities of Na(+),K(+)-ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats. Brain Res, v.1302, Dec 11, p.248-55. 2009.

Benowitz, N. L., S. M. Hall, *et al.* Persistent increase in caffeine concentrations in people who stop smoking. BMJ, v.298, n.6680, Apr 22, p.1075-6. 1989.

Berchtold, N. C., G. Chinn, *et al.* Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. Neuroscience, v.133, n.3, p.853-61. 2005.

Berchtold, N. C., J. P. Kesslak, *et al.* Hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene regulation by exercise and the medial septum. J Neurosci Res, v.68, n.5, Jun 1, p.511-21. 2002.

Bexfield, N. A., A. C. Parcell, *et al.* Adaptations to high-intensity intermittent exercise in rodents. J Appl Physiol, v.107, n.3, Sep, p.749-54. 2009.

Borg, G. A. Psychophysical bases of perceived exertion. Med Sci Sports Exerc, v.14, n.5, p.377-81. 1982.

Bours, M. J., E. L. Swennen, *et al.* Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacol Ther, v.112, n.2, Nov, p.358-404. 2006.

Bracco, D., J. M. Ferrarra, *et al.* Effects of caffeine on energy metabolism, heart rate, and methylxanthine metabolism in lean and obese women. Am J Physiol, v.269, n.4 Pt 1, Oct, p.E671-8. 1995.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Brundege, J. M. e T. V. Dunwiddie. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. Adv Pharmacol, v.39, p.353-91. 1997.

Burgomaster, K. A., K. R. Howarth, *et al.* Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. J Physiol, v.586, n.1, Jan 1, p.151-60. 2008.

Burgomaster, K. A., S. C. Hughes, *et al.* Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. J Appl Physiol, v.98, n.6, Jun, p.1985-90. 2005.

Burnstock, G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. Clin Med, v.2, n.1, Jan-Feb, p.45-53. 2002.

_____. Purinergic signalling. Br J Pharmacol, v.147 Suppl 1, Jan, p.S172-81. 2006.

Carter, A. J., W. T. O'connor, *et al.* Caffeine enhances acetylcholine release in the hippocampus in vivo by a selective interaction with adenosine A1 receptors. J Pharmacol Exp Ther, v.273, n.2, May, p.637-42. 1995.

Caspersen, C. J., K. E. Powell, *et al.* Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. Public Health Rep, v.100, n.2, Mar-Apr, p.126-31. 1985.

Chan, K. M., D. Delfert, *et al.* A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. Anal Biochem, v.157, n.2, Sep, p.375-80. 1986.

Chen, H. I. e Y. L. Liao. Effects of chronic exercise on muscarinic receptor-mediated vasodilation in rats. Chin J Physiol, v.41, n.3, Sep 30, p.161-6. 1998.

Chen, J. F. e F. Pedata. Modulation of ischemic brain injury and neuroinflammation by adenosine A2A receptors. Curr Pharm Des, v.14, n.15, p.1490-9. 2008.

Ciruela, F., V. Casado, *et al.* Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. J Neurosci, v.26, n.7, Feb 15, p.2080-7. 2006.

Colgan, S. P., H. K. Eltzschig, *et al.* Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). Purinergic Signal, v.2, n.2, Jun, p.351-60. 2006.

Collomp, K., F. Anselme, *et al.* Effects of moderate exercise on the pharmacokinetics of caffeine. Eur J Clin Pharmacol, v.40, n.3, p.279-82. 1991.

Connett, R. J. Models of steady-state control of skeletal muscle VO₂ evaluation using tissue data. Adv Exp Med Biol, v.227, p.215-9. 1988.

Costill, D. L., G. P. Dalsky, *et al.* Effects of caffeine ingestion on metabolism and exercise performance. Med Sci Sports, v.10, n.3, Fall, p.155-8. 1978.

Cotman, C. W. e N. C. Berchtold. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. Trends Neurosci, v.25, n.6, Jun, p.295-301. 2002.

Cotman, C. W., W. W. Poon, *et al.* The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology. J Neuropathol Exp Neurol, v.64, n.2, Feb, p.104-12. 2005.

Cunha, R. A., A. M. Sebastiao, *et al.* Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors. J Neurosci, v.18, n.6, Mar 15, p.1987-95. 1998.

Da Silva, A. S., S. G. Monteiro, *et al.* Trypanosoma evansi: immune response and acetylcholinesterase activity in lymphocytes from infected rats. Exp Parasitol, v.127, n.2, Feb, p.475-80. 2011.

Da Silva, R. S., A. N. Bruno, *et al.* Acute caffeine treatment increases extracellular nucleotide hydrolysis from rat striatal and hippocampal synaptosomes. Neurochem Res, v.28, n.8, Aug, p.1249-54. 2003.

Davis, J. K. e J. M. Green. Caffeine and anaerobic performance: ergogenic value and mechanisms of action. Sports Med, v.39, n.10, p.813-32. 2009.

Davis, J. M. e S. P. Bailey. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.29, n.1, p.45-57. 1997.

Davis, J. M., R. S. Welsh, *et al.* Effects of carbohydrate and chromium ingestion during intermittent high-intensity exercise to fatigue. Int J Sport Nutr Exerc Metab, v.10, n.4, Dec, p.476-85. 2000.

Davis, J. M., Z. Zhao, *et al.* Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.284, n.2, Feb, p.R399-404. 2003.

Deaglio, S., K. M. Dwyer, *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med, v.204, n.6, Jun 11, p.1257-65. 2007.

Deaglio, S. e S. C. Robson. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. Adv Pharmacol, v.61, p.301-32. 2011.

Descarries, L., V. Gisiger, *et al.* Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. Prog Neurobiol, v.53, n.5, Dec, p.603-25. 1997.

Deutsch, V. R., M. Pick, *et al.* The stress-associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. Exp Hematol, v.30, n.10, Oct, p.1153-61. 2002.

Di Iorio, P., P. Ballerini, *et al.* Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. Pharmacol Res, v.37, n.3, Mar, p.169-78. 1998.

Dorossiev, D. L. Methodology of physical training, principles of training and exercise prescription. Adv Cardiol, n.24, p.67-83. 1978.

Dunwiddie, T. V. e S. A. Masino. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. Annu Rev Neurosci, v.24, p.31-55. 2001.

Dvir, H., I. Silman, *et al.* Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. Chem Biol Interact, v.187, n.1-3, Sep 6, p.10-22. 2010.

Edwards, A. M., N. V. Challis, *et al.* VO₂ kinetics determined by PRBS techniques differentiate elite endurance runners from elite sprinters. Int J Sports Med, v.20, n.1, Jan, p.1-6. 1999.

Ellman, G. L., K. D. Courtney, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol, v.7, Jul, p.88-95. 1961.

Everett, M. D., A. M. Kinser, *et al.* Physical fitness and performance. Training for old age: production functions for the aerobic exercise inputs. Med Sci Sports Exerc, v.39, n.12, Dec, p.2226-33. 2007.

Fernandez, H. L. e J. A. Donoso. Exercise selectively increases G4 AChE activity in fast-twitch muscle. J Appl Physiol, v.65, n.5, Nov, p.2245-52. 1988.

Fernandez, H. L. e C. A. Hodges-Savola. Physiological regulation of G4 AChE in fast-twitch muscle: effects of exercise and CGRP. J Appl Physiol, v.80, n.1, Jan, p.357-62. 1996.

Fredholm, B. B. Adenosine receptors as drug targets. Exp Cell Res, v.316, n.8, May 1, p.1284-8. 2010.

Fredholm, B. B., G. Arslan, *et al.* Structure and function of adenosine receptors and their genes. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, v.362, n.4-5, Nov, p.364-74. 2000.

Fredholm, B. B., K. Battig, *et al.* Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. Pharmacol Rev, v.51, n.1, Mar, p.83-133. 1999.

Gaspersic, R., B. Koritnik, *et al.* Acetylcholinesterase in the neuromuscular junction. Chem Biol Interact, v.119-120, May 14, p.301-8. 1999.

Gastin, P. B. Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. Sports Med, v.31, n.10, p.725-41. 2001.

Gibala, M. J., J. P. Little, *et al.* Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. J Physiol, Jan 30. 2012.

Gibala, M. J., J. P. Little, *et al.* Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. J Physiol, v.575, n.Pt 3, Sep 15, p.901-11. 2006.

Giesel, V. T., M. Reche, *et al.* Effects of intermittent high-intensity exercise and carbohydrate supplementation on IGF-1 and glycogen of Wistar rats. Growth Horm IGF Res, v.19, n.2, Apr, p.156-61. 2009.

Gisiger, V., M. Belisle, *et al.* Acetylcholinesterase adaptation to voluntary wheel running is proportional to the volume of activity in fast, but not slow, rat hindlimb muscles. Eur J Neurosci, v.6, n.5, May 1, p.673-80. 1994.

Gladden, L. B. Net lactate uptake during progressive steady-level contractions in canine skeletal muscle. J Appl Physiol, v.71, n.2, Aug, p.514-20. 1991.

Gliottoni, R. C., J. R. Meyers, *et al.* Effect of caffeine on quadriceps muscle pain during acute cycling exercise in low versus high caffeine consumers. Int J Sport Nutr Exerc Metab, v.19, n.2, Apr, p.150-61. 2009.

Gomes, C. V., M. P. Kaster, *et al.* Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. Biochim Biophys Acta, v.1808, n.5, May, p.1380-99. 2011.

Goncalves, J. F., A. M. Fiorenza, *et al.* N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. Chem Biol Interact, v.186, n.1, Jun 7, p.53-60. 2010.

Graham, T. E. Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. Sports Med, v.31, n.11, p.785-807. 2001.

Graham, T. E., D. S. Battram, *et al.* Does caffeine alter muscle carbohydrate and fat metabolism during exercise? Appl Physiol Nutr Metab, v.33, n.6, Dec, p.1311-8. 2008.

Graham Te, H. E., Sathasivan P. Metabolic and endurance exercise effects of coffee and caffeine ingestion. J Appl Physiol, v.85, p.883-89. 1998.

Graham, T. E., E. Hibbert, *et al.* Metabolic and exercise endurance effects of coffee and caffeine ingestion. J Appl Physiol, v.85, n.3, Sep, p.883-9. 1998.

Graham, T. E., J. W. Rush, *et al.* Caffeine and exercise: metabolism and performance. Can J Appl Physiol, v.19, n.2, Jun, p.111-38. 1994.

Graham, T. E. e L. L. Spriet. Performance and metabolic responses to a high caffeine dose during prolonged exercise. J Appl Physiol, v.71, n.6, Dec, p.2292-8. 1991.

Greer, F., C. Mclean, *et al.* Caffeine, performance, and metabolism during repeated Wingate exercise tests. J Appl Physiol, v.85, n.4, Oct, p.1502-8. 1998.

Halliday, F. C. e A. J. Gibb. Neuropharmacology: a part for purines in pattern generation. Curr Biol, v.7, n.1, Jan 1, p.R47-9. 1997.

Jacobson, K. A., D. K. Von Lubitz, *et al.* Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment. Trends Pharmacol Sci, v.17, n.3, Mar, p.108-13. 1996.

Jaques, J. A., J. F. Rezer, *et al.* Curcumin protects against cigarette smoke-induced cognitive impairment and increased acetylcholinesterase activity in rats. Physiol Behav, v.106, n.5, May 8, p.664-669. 2012.

Jaques, J. A., J. F. Rezer, *et al.* The effect of curcumin in the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats. Cell Biochem Funct, v.29, n.8, Dec, p.703-7. 2011.

Jusko, W. J., M. J. Gardner, *et al.* Factors affecting theophylline clearances: age, tobacco, marijuana, cirrhosis, congestive heart failure, obesity, oral contraceptives, benzodiazepines, barbiturates, and ethanol. J Pharm Sci, v.68, n.11, Nov, p.1358-66. 1979.

Karadsheh, N., P. Kussie, *et al.* Inhibition of acetylcholinesterase by caffeine, anabasine, methyl pyrrolidine and their derivatives. Toxicol Lett, v.55, n.3, Mar, p.335-42. 1991.

Katz, A. e K. Sahlin. Regulation of lactic acid production during exercise. J Appl Physiol, v.65, n.2, Aug, p.509-18. 1988.

_____. Role of oxygen in regulation of glycolysis and lactate production in human skeletal muscle. Exerc Sport Sci Rev, v.18, p.1-28. 1990.

Kawanaka, K., I. Tabata, *et al.* Effects of high-intensity intermittent swimming on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. J Appl Physiol, v.84, n.6, Jun, p.1852-7. 1998.

Kawashima, K. e T. Fujii. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. Life Sci, v.74, n.6, Dec 26, p.675-96. 2003.

Koshinaka, K., E. Kawasaki, *et al.* Effect of acute high-intensity intermittent swimming on post-exercise insulin responsiveness in epitrochlearis muscle of fed rats. Metabolism, v.58, n.2, Feb, p.246-53. 2009.

Kukulski, F., S. A. Levesque, *et al.* Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. Adv Pharmacol, v.61, p.263-99. 2011.

Latini, S. e F. Pedata. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. J Neurochem, v.79, n.3, Nov, p.463-84. 2001.

Laursen, P. B. e D. G. Jenkins. The scientific basis for high-intensity interval training: optimising training programmes and maximising performance in highly trained endurance athletes. Sports Med, v.32, n.1, p.53-73. 2002.

Leal, D. B., C. A. Streher, *et al.* HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. Biochim Biophys Acta, v.1746, n.2, Dec 15, p.129-34. 2005.

Leandro, C. G., T. Martins De Lima, *et al.* Physical training attenuates the stress-induced changes in rat T-lymphocyte function. Neuroimmunomodulation, v.13, n.2, p.105-13. 2006.

Little, J. P., A. Safdar, *et al.* An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1alpha and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.300, n.6, Jun, p.R1303-10. 2011.

Lloyd, H. G., K. Lindstrom, *et al.* Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation or energy depletion. Neurochem Int, v.23, n.2, Aug, p.173-85. 1993.

Lotti, M. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. Clin Chem, v.41, n.12 Pt 2, Dec, p.1814-8. 1995.

Matsui, T., T. Ishikawa, *et al.* Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise. J Physiol, v.590, n.Pt 3, Feb 1, p.607-16. 2012.

Maughan, R. J. The limits of human athletic performance. Ann Transplant, v.10, n.4, p.52-4. 2005.

Mazzardo-Martins, L., D. F. Martins, *et al.* High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. J Pain, v.11, n.12, Dec, p.1384-93. 2010.

Mesulam, M. M., A. Guillozet, *et al.* Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. Neuroscience, v.110, n.4, p.627-39. 2002.

Nagy, A. e A. V. Delgado-Escueta. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). J Neurochem, v.43, n.4, Oct, p.1114-23. 1984.

Neary, J. T. e H. Zimmermann. Trophic functions of nucleotides in the central nervous system. Trends Neurosci, v.32, n.4, Apr, p.189-98. 2009.

Nosaka, K. e P. M. Clarkson. Influence of previous concentric exercise on eccentric exercise-induced muscle damage. J Sports Sci, v.15, n.5, Oct, p.477-83. 1997.

O'Connor, P. J., R. W. Motl, *et al.* Dose-dependent effect of caffeine on reducing leg muscle pain during cycling exercise is unrelated to systolic blood pressure. Pain, v.109, n.3, Jun, p.291-8. 2004.

Oliff, H. S., N. C. Berchtold, *et al.* Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. Brain Res Mol Brain Res, v.61, n.1-2, Oct 30, p.147-53. 1998.

Paraoanu, L. E. e P. G. Layer. Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation. FEBS J, v.275, n.4, Feb, p.618-24. 2008.

Plaskett, C. J. e E. Cafarelli. Caffeine increases endurance and attenuates force sensation during submaximal isometric contractions. J Appl Physiol, v.91, n.4, Oct, p.1535-44. 2001.

Pritsos, C. A. Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system. Chem Biol Interact, v.129, n.1-2, Dec 1, p.195-208. 2000.

Rakobowchuk, M., S. Tanguay, *et al.* Sprint interval and traditional endurance training induce similar improvements in peripheral arterial stiffness and flow-mediated dilation in healthy humans. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.295, n.1, Jul, p.R236-42. 2008.

Rakonczay, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. Acta Biol Hung, v.54, n.2, p.183-9. 2003.

Rathbone, M. P., P. J. Middlemiss, *et al.* Trophic effects of purines in neurons and glial cells. Prog Neurobiol, v.59, n.6, Dec, p.663-90. 1999.

Ribeiro, J. A. e A. M. Sebastiao. Caffeine and adenosine. J Alzheimers Dis, v.20 Suppl 1, p.S3-15. 2010.

Ribeiro, J. A., A. M. Sebastiao, *et al.* Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. Prog Neurobiol, v.68, n.6, Dec, p.377-92. 2002.

Robson, S. C., J. Sevigny, *et al.* The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signal, v.2, n.2, Jun, p.409-30. 2006.

Rocha, J. B., T. Emanuelli, *et al.* Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. Acta Neurobiol Exp (Wars), v.53, n.3, p.431-7. 1993.

Rosenberry, T. L. Strategies to resolve the catalytic mechanism of acetylcholinesterase. J Mol Neurosci, v.40, n.1-2, Jan, p.32-9. 2010.

Rosso, A., J. Mossey, *et al.* Caffeine: neuroprotective functions in cognition and Alzheimer's disease. Am J Alzheimers Dis Other Dement, v.23, n.5, Oct-Nov, p.417-22. 2008.

Schetinger, M. R., V. L. Vieira, *et al.* ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, v.128, n.4, Apr, p.731-41. 2001.

Schmatz, R., C. M. Mazzanti, *et al.* Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. Eur J Pharmacol, v.610, n.1-3, May 21, p.42-8. 2009.

Schmatz, R., L. B. Perreira, *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, Feb, p.374-83. 2012.

Shen, H., L. Tong, *et al.* Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. Neuroscience, v.107, n.2, p.219-29. 2001.

Shi, D., O. Nikodijevic, *et al.* Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. Cell Mol Neurobiol, v.13, n.3, Jun, p.247-61. 1993.

Shryock, J. C. e L. Belardinelli. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. Am J Cardiol, v.79, n.12A, Jun 19, p.2-10. 1997.

Silman, I. e J. L. Sussman. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. Curr Opin Pharmacol, v.5, n.3, Jun, p.293-302. 2005.

Simmonds, M. J., C. L. Minahan, *et al.* Caffeine improves supramaximal cycling but not the rate of anaerobic energy release. Eur J Appl Physiol, v.109, n.2, May, p.287-95. 2010.

Sinclair, C. J. e J. D. Geiger. Caffeine use in sports. A pharmacological review. J Sports Med Phys Fitness, v.40, n.1, Mar, p.71-9. 2000.

Siow, N. L., H. Q. Xie, *et al.* ATP induces the post-synaptic gene expression in neuron-neuron synapses: Transcriptional regulation of AChE catalytic subunit. Chem Biol Interact, v.157-158, Dec 15, p.423-6. 2005.

Siqueira, I. R., V. R. Elsner, *et al.* A neuroprotective exercise protocol reduces the adenine nucleotide hydrolysis in hippocampal synaptosomes and serum of rats. Brain Res, v.1316, Feb 26, p.173-80. 2010.

Solinas, M., S. Ferre, *et al.* Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. J Neurosci, v.22, n.15, Aug 1, p.6321-4. 2002.

Soreq, H. e S. Seidman. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. Nat Rev Neurosci, v.2, n.4, Apr, p.294-302. 2001.

Spanevello, R. M., C. M. Mazzanti, *et al.* The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. Clin Chim Acta, v.411, n.3-4, Feb, p.210-4. 2010.

Spindel, E. Action of the methylxanthines on the pituitary and pituitary-dependent hormones. Prog Clin Biol Res, v.158, p.355-63. 1984.

Spriet, L. L., D. A. Maclean, *et al.* Caffeine ingestion and muscle metabolism during prolonged exercise in humans. Am J Physiol, v.262, n.6 Pt 1, Jun, p.E891-8. 1992.

Staron, R. S., F. C. Hagerman, *et al.* Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. J Histochem Cytochem, v.48, n.5, May, p.623-9. 2000.

Stauber, W. T. Eccentric action of muscles: physiology, injury, and adaptation. Exerc Sport Sci Rev, v.17, p.157-85. 1989.

Steiner, J. L., E. A. Murphy, *et al.* Exercise Training Increases Mitochondrial Biogenesis in the Brain. J Appl Physiol, Aug 4. 2011.

Swain, D. P. e B. A. Franklin. Comparison of cardioprotective benefits of vigorous versus moderate intensity aerobic exercise. Am J Cardiol, v.97, n.1, Jan 1, p.141-7. 2006.

Swain, R. A., A. B. Harris, *et al.* Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. Neuroscience, v.117, n.4, p.1037-46. 2003.

Tabata, I., K. Nishimura, *et al.* Effects of moderate-intensity endurance and high-intensity intermittent training on anaerobic capacity and VO₂max. Med Sci Sports Exerc, v.28, n.10, Oct, p.1327-30. 1996.

Tang, A., K. M. Sibley, *et al.* Effects of an aerobic exercise program on aerobic capacity, spatiotemporal gait parameters, and functional capacity in subacute stroke. Neurorehabil Neural Repair, v.23, n.4, May, p.398-406. 2009.

Tarnopolsky, M. A. Effect of caffeine on the neuromuscular system--potential as an ergogenic aid. Appl Physiol Nutr Metab, v.33, n.6, Dec, p.1284-9. 2008.

Terada, S., K. Kawanaka, *et al.* Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1 α protein expression in rat skeletal muscle. Acta Physiol Scand, v.184, n.1, May, p.59-65. 2005.

Terada, S., T. Yokozeki, *et al.* Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. J Appl Physiol, v.90, n.6, Jun, p.2019-24. 2001.

Thein, L. A., J. M. Thein, *et al.* Ergogenic aids. Phys Ther, v.75, n.5, May, p.426-39. 1995.

Thome, G. R., R. M. Spanevello, *et al.* Vitamin E decreased the activity of acetylcholinesterase and level of lipid peroxidation in brain of rats exposed to aged and diluted sidestream smoke. Nicotine Tob Res, v.13, n.12, Dec, p.1210-9. 2011.

Tomlin, D. L. e H. A. Wenger. The relationship between aerobic fitness and recovery from high intensity intermittent exercise. Sports Med, v.31, n.1, p.1-11. 2001.

Tucek, S. The use of choline acetyltransferase for measuring the synthesis of acetyl-coenzyme A and its release from brain mitochondria. Biochem J, v.104, n.3, Sep, p.749-56. 1967.

Ursing, C., J. Wikner, *et al.* Caffeine raises the serum melatonin level in healthy subjects: an indication of melatonin metabolism by cytochrome P450(CYP)1A2. J Endocrinol Invest, v.26, n.5, May, p.403-6. 2003.

Van Der Borght, K., D. E. Kobor-Nyakas, *et al.* Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis. Hippocampus, v.19, n.10, Oct, p.928-36. 2009.

Van Soeren, M. H. e T. E. Graham. Effect of caffeine on metabolism, exercise endurance, and catecholamine responses after withdrawal. J Appl Physiol, v.85, n.4, Oct, p.1493-501. 1998.

Vuckovic, M. G., Q. Li, *et al.* Exercise elevates dopamine D2 receptor in a mouse model of Parkinson's disease: in vivo imaging with [(1)F]fallypride. Mov Disord, v.25, n.16, Dec 15, p.2777-84. 2010.

Walsh, J. K., M. J. Muehlbach, *et al.* Effect of caffeine on physiological sleep tendency and ability to sustain wakefulness at night. Psychopharmacology (Berl), v.101, n.2, p.271-3. 1990.

Wang, S. J. Caffeine facilitation of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes) through activation protein kinase C pathway: an interaction with presynaptic adenosine A1 receptors. Synapse, v.61, n.6, Jun, p.401-11. 2007.

Weiler-Ravell, D. e B. J. Whipp. Exercise and the anaerobic threshold. Lancet, v.1, n.8337, Jun 11, p.1338-9. 1983.

Wiley, J. P. e E. C. Rhodes. The relationship of individual anaerobic thresholds to total, alactic and lactic oxygen debts after a set treadmill run. Can J Appl Sport Sci, v.11, n.1, Mar, p.37-41. 1986.

Yegutkin, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochim Biophys Acta, v.1783, n.5, May, p.673-94. 2008.

Yegutkin, G. G., T. Henttinen, *et al.* Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. FASEB J, v.15, n.1, Jan, p.251-260. 2001.

Yegutkin, G. G., S. S. Samburski, *et al.* ATP-consuming and ATP-generating enzymes secreted by pancreas. J Biol Chem, v.281, n.40, Oct 6, p.29441-7. 2006.

Zhang, Q., Y. Wu, *et al.* Exercise induces mitochondrial biogenesis after brain ischemia in rats. Neuroscience, v.205, Mar 15, p.10-7. 2012.

Zhou, Y., S. Wang, *et al.* Catalytic reaction mechanism of acetylcholinesterase determined by Born-Oppenheimer ab initio QM/MM molecular dynamics simulations. J Phys Chem B, v.114, n.26, Jul 8, p.8817-25. 2010.

Ziemann, E., T. Grzywacz, *et al.* Aerobic and anaerobic changes with high-intensity interval training in active college-aged men. J Strength Cond Res, v.25, n.4, Apr, p.1104-12. 2011.

Zimmermann, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. Prog Neurobiol, v.49, n.6, Aug, p.589-618. 1996.

_____. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.362, n.4-5, Nov, p.299-309. 2000.

_____. ATP and acetylcholine, equal brethren. Neurochem Int, v.52, n.4-5, Mar-Apr, p.634-48. 2008.

_____. Purinergic signaling in neural development. Semin Cell Dev Biol, v.22, n.2, Apr, p.194-204. 2011.

Zulak, K. G., D. K. Liscombe, *et al.* Alkaloids. In: (Ed.). Plant Secondary Metabolites: Blackwell Publishing Ltd, 2007. Alkaloids, p.102-136