



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE DESPORTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

ALEXANDRE FRANCISCO SOLANO

Mecanismos Moleculares Envolvidos no Efeito Anti-inflamatório da Cafeína

FLORIANÓPOLIS

2021

ALEXANDRE FRANCISCO SOLANO

Mecanismos Moleculares Envolvidos no Efeito Anti-inflamatório da Cafeína

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de Doutor em Educação Física.

Orientadora: Alexandra Susana Latini

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva

FLORIANÓPOLIS

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Scheffer, Débora da Luz
METABOLISMO DAS PTERINAS E DA DOPAMINA EM
MECANISMOS DE NOCICEPÇÃO E FADIGA / Débora da Luz
Scheffer ; orientadora, Alexandra Susana Latini,
coorientador, Aderbal Silva Aguiar Junior, 2017.
146 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Desportos, Programa de Pós
Graduação em Educação Física, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Educação Física. 2. Fadiga. 3. Doença de
Parkinson. 4. Tetrahydrobiopterina. 5. Atividade
física. I. Latini, Alexandra Susana. II. Aguiar
Junior, Aderbal Silva . III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Educação Física. IV. Título.

ALEXANDRE FRANCISCO SOLANO

“Mecanismos Moleculares Envolvidos no Efeito Anti-inflamatório da Cafeína”

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora (ata 003/2021/PPGEF) composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Débora da Luz Scheffer – USP.

Prof. Dr. Luiz Guilherme Antonacci Guglielmo – Departamento de Ed. Física/UFSC.

Prof. Dr. Alex Rafacho – Centro de Ciências Biológicas/UFSC.

Prof. Dr. Alexandre Pastoris Muller – Centro de Ciências Biológicas/UFSC (suplente).

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em **Doutor em Educação Física**.

Prof. Dra. Kelly Samara da Silva

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Educação Física

Prof. Dra. Alexandra Susana Latini

Orientadora

FLORIANÓPOLIS

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de crescimento.

À minha família e amigos que sempre estiveram me apoiando.

À minha orientadora, profa. Dra. Alexandra Latini, pela paciência, generosidade e ensinamentos ao longo desta etapa.

Ao meu coorientador prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva, pela paciência e pelo auxílio incondicional.

A todos os amigos do Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (LABOX): Ananda, Bruna, Débora, Geianni, Tuani, Fernandinha e Luizinha. E um agradecimento muito especial a minha irmãzinha Jennyffer e ao Leo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física.

A esta universidade, seu corpo docente, corpo técnico, direção e administração que oportunizaram e colaboraram na realização deste trabalho.

Agradeço pela vida de todos os animais utilizados neste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta conquista, o meu muito obrigado!

“Conheça a ti mesmo e conhecerás o universo e os deuses”.

Inscrita à entrada do santuário de Delfos, difundida por Sócrates.

RESUMO

A cafeína é um estimulante amplamente utilizado pelas suas propriedades ergogênicas. A ação farmacológica da cafeína, consiste no antagonismo dos receptores adenosinérgicos A_1 e A_{2A} . O antagonismo desses receptores promove efeitos no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico que reduzem a dor, a percepção de esforço, e aumentam o recrutamento motor. Os receptores adenosinérgicos tem sido proposto como mecanismo, pelo qual a cafeína exerce seu efeito ergogênico e anti-inflamatório. O perfil plasmático de citocinas tem sido empregado por vários grupos de pesquisa como biomarcadores de recuperação ao exercício. Alguns estudos acerca do efeito anti-inflamatório da cafeína, tem foco em modelo *in vitro*. No entanto, modelos *in vivo* têm sido negligenciados. Considerando que os mecanismos pela qual a cafeína exerce sua atividade protetora neuromuscular são pouco explorados, bem como, que a idade e o momento da administração da cafeína podem impactar no seu efeito ergogênico. O objetivo deste estudo, foi investigar o efeito citoprotetor e anti-inflamatório da cafeína. Assim como, também avaliar o efeito ergogênico da cafeína em camundongos C57BL/6, machos entre 3 e 7 meses de idade, submetidos a um teste de esforço físico máximo após 30 min da administração da cafeína (6 mg/kg; intraperitoneal). Os animais que receberam cafeína atingiram velocidades mais altas e permaneceram mais tempo no desafio da esteira, quando comparados com os animais que receberam o veículo. Posteriormente, para determinar se a administração da cafeína em 30 min estava no pico no momento do teste, investigamos a farmacocinética da cafeína em camundongos C57BL/6, machos com 3 meses de idade, no estado de repouso e em outro grupo de animais após terem sido submetidos a 30 min na esteira rolante. Este desenho experimental teve a finalidade de ativar o sistema nervoso simpático. Assim, demonstramos que em ambos os grupos o pico plasmático da cafeína, nas regiões encefálicas (estriado, córtex pré-frontal e hipocampo) e músculos esqueléticos (quadríceps e tibial anterior) foi de 15 min. Demonstramos, ainda, que a distribuição da cafeína nos tecidos difere significativamente. Nos camundongos submetidos a atividade física a concentração da cafeína calculada em pmol/mg de tecido foi: córtex pré-frontal=2179; hipocampo=485; estriado=282; quadríceps=756 e tibial anterior=264; revelando uma concentração da cafeína quase 8 vezes maior no córtex pré-frontal em relação ao estriado e cerca de 3 vezes maior no quadríceps em relação ao tibial anterior. Prosseguindo, com o intuito de verificar o efeito citoprotetor e anti-inflamatório da cafeína, utilizamos um modelo de inflamação em camundongos suíços, machos com 3 meses de idade que foram divididos em 4 grupos. Cada grupo recebeu uma dose intraperitoneal de salina ou cafeína (6 mg/kg) e 15 min após receberam salina ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33 mg/kg). A seguir a expressão de genes relacionados com a resposta inflamatória, os receptores adenosinérgicos, biogênese mitocondrial e metabolismo muscular foram avaliados no quadríceps 24 h após a indução de inflamação. Observou-se que a expressão do gene *Il-1 β* aumentou nos animais tratados com LPS, revelando um estado inflamatório e que a cafeína apresentou uma resposta anti-inflamatória caracterizada pelo aumento da expressão dos genes de *Il-13*. A cafeína, também inibiu a expressão dos genes *ASC1* e *caspases-1*, principais componentes do inflamassoma. Ainda, a cafeína modulou, positivamente, a expressão do gene do receptor de adenosina *Adora2*. Quando avaliado os genes relacionados a biogênese mitocondrial (*Pgc-1 α* e *Ampk*), a administração de LPS e de cafeína, separadamente, reduziram a expressão genica de *Pgc-1 α* , efeito que foi potenciado no tratamento em conjunto (LPS + cafeína). Em relação a *Ampk*, o tratamento com LPS promoveu a expressão do gene *Ampk*, que foi prevenido pelo pré-tratamento com cafeína. Em conclusão, nossos resultados sugerem que o efeito ergogênico da cafeína, uma única dose, ocorre independentemente da idade. Ao utilizar a cafeína,

devemos dar atenção ao seu pico de ação. Sugerimos que a cafeína melhorou o desempenho, possivelmente, por ativar o SNC via antagonismo do receptor A_{2A}. Ainda, indicamos que o pré-tratamento, com uma dose única de cafeína, pode apresentar uma ação protetora muscular, modulando a resposta inflamatória muscular.

Palavras-chave: cafeína, desempenho, lipopolissacarídeo, inflamação.

ABSTRACT

Caffeine is a widely used stimulant for its ergogenic properties. The pharmacological action of caffeine consists in the antagonism of adenosinergic A₁ and A_{2A} receptors. The antagonism of these receptors promotes effects on the central nervous system (CNS) and on the peripheral nervous system that reduce pain, exertion perception, and increase motor recruitment. Adenosinergic receptors have been proposed as a mechanism by which caffeine exerts its ergogenic and anti-inflammatory effect. The plasma cytokine profile has been used by several research groups as exercise recovery biomarkers. Some studies on the anti-inflammatory effect of caffeine focus on an *in vitro* model. However, *in vivo* models have been neglected. Considering that the mechanisms by which caffeine exerts its neuromuscular protective activity are poorly explored, as well as that age and timing of caffeine administration may impact its ergogenic effect. The aim of this study was to investigate the cytoprotective and anti-inflammatory effect of caffeine. As well as evaluating the ergogenic effect of caffeine in C57BL/6 mice, males between 3 and 7 months of age, submitted to a maximum physical exertion test 30 min after caffeine administration (6 mg/kg; intraperitoneal). Animals that received caffeine achieved higher speeds and stayed longer on the treadmill challenge when compared to animals that received the vehicle. Subsequently, to determine whether caffeine administration within 30 min was at its peak at the time of testing, we investigated the pharmacokinetics of caffeine in 3-month-old male C57BL/6 mice in the resting state and in another group of animals after having been subjected to 30 min on the treadmill. This experimental design was intended to activate the sympathetic nervous system. Thus, we demonstrate that in both groups the plasma caffeine peak, in the brain regions (striatum, prefrontal cortex and hippocampus) and skeletal muscles (quadriceps and tibialis anterior) was 15 min. We also demonstrate that the distribution of caffeine in tissues differs significantly. In mice submitted to physical activity, the caffeine concentration calculated in pmol/mg tissue was: prefrontal cortex=2179; hippocampus=485; striated=282; quadriceps=756 and tibialis anterior=264; revealing a concentration of caffeine almost 8 times higher in the prefrontal cortex compared to the striatum and about 3 times higher in the quadriceps compared to the tibialis anterior. Continuing, in order to verify the cytoprotective and anti-inflammatory effect of caffeine, we used a model of inflammation in Swiss mice, 3-month-old males that were divided into 4 groups. Each group received an intraperitoneal dose of saline or caffeine (6 mg/kg) and 15 min later received saline or bacterial lipopolysaccharide (LPS; 0.33 mg/kg). Next, the expression of genes related to the inflammatory response, adenosinergic receptors, mitochondrial biogenesis and muscle metabolism were evaluated in the quadriceps 24 h after inflammation induction. It was observed that the expression of the Il1- β gene increased in animals treated with LPS, revealing an inflammatory state and that caffeine presented an anti-inflammatory response characterized by increased expression of the Il-13 genes. Caffeine also inhibited the expression of ASC1 and caspases-1 genes, the main components of the inflammasome. In addition, caffeine positively modulated the expression of the Adora2 adenosine receptor gene. When the genes related to mitochondrial biogenesis (Pgc-1 α and Ampk) were evaluated, the administration of LPS and caffeine, separately, reduced the gene expression of Pgc-1 α , an effect that was enhanced in the combined treatment (LPS + caffeine). Regarding Ampk, LPS treatment promoted the expression of the Ampk gene, which was prevented by pretreatment with caffeine. In conclusion, our results suggest that the ergogenic effect of caffeine, a single dose, occurs regardless of age. When using caffeine, we must pay attention to its peak of action. We suggest that caffeine improved performance, possibly by activating the CNS via A_{2A} receptor antagonism. Furthermore,

we indicate that pretreatment, with a single dose of caffeine, may have a muscle protective action, modulating the muscle inflammatory response.

Keywords: caffeine, performance, lipopolysaccharide, inflammation.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Concentração de cafeína plasmática durante exercício até a exaustão.....	15
Figura 2: Potenciais mecanismos que contribuem para os efeitos anti-inflamatórios promovido pelo exercício físico.	26
Figura 3: Representação gráfica do teste incremental máximo.	31
Figura 4: Distribuição da cafeína no sangue, nos músculos esqueléticos quadríceps e tibial anterior, e nas regiões cerebrais, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. ..	36
Figura 5: Efeito da administração da cafeína sobre o desempenho físico em animais submetidos a um teste de esforço máximo em esteira.	38
Figura 6: Quantificação do efeito ergogênico da cafeína.	40
Figura 7: Grau de fosforilação da proteína cinase dependente de AMP (AMPK) em animais submetidos a teste de esforço máximo e à administração de cafeína.....	42
Figura 8: Representação gráfica do modelo experimental.	49
Figura 9: Esquema do tratamento do DNA.	53
Figura 10: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de cafeína sobre a resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS) no quadríceps de roedores.	56
Figura 11: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de cafeína sobre a ativação do inflamassoma NLRP3 induzida por lipopolissacarídeo (LPS) no quadríceps de roedores.....	58
Figura 12: Efeito do pré-tratamento com cafeína na expressão de genes relacionado com a sinalização adenosínérgica no quadríceps de roedores submetidos a inflamação pela administração de lipopolissacarídeo (LPS).	60
Figura 13: Efeito do pré-tratamento com cafeína na expressão de genes relacionado com o metabolismo oxidativo no quadríceps de roedores submetidos a inflamação pela administração de lipopolissacarídeo (LPS).....	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Conteúdo de cafeína em diversas bebidas.....	12
Tabela 2- Receptores de adenosina humanos	15
Tabela 3: Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica.	52

ÍNDICE DE ANEXOS – ARTIGOS PUBLICADOS

ANEXO 1: Treating depression with exercise: The inflammasome inhibition perspective.	67
ANEXO 2: Potential pitfalls when investigating the ergogenic effects of caffeine in mice.....	68
ANEXO 3: Epigenetic modifications induced by exercise: Drug-free intervention to improve cognitive deficits associated with Obesity.....	69
ANEXO 4: Role of Adenosine A2A Receptors in the Central Fatigue of Neurodegenerative Diseases.	70
ANEXO 5: Physical Exercise Potentials Against Viral Diseases Like COVID-19 in the Elderly.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

A₁: receptor de adenosina subtipo A₁

A₂: receptor de adenosina subtipo A₂

AMPK: proteína cinase ativada por AMP

COI: Comitê Olímpico Internacional

DAMPS: padrões moleculares associados a dano

HPLC: cromatografia líquida de alta resolução

IFN- γ : interferon- γ

IL-10: interleucina-10

IL-13: interleucina-13

IL-1 β : interleucina-1 β

IL-6: interleucina-6

LPS: lipopolissacarídeo

NF- κ B: fator nuclear kappa- β

NOS: óxido nítrico sintase

ON: óxido nítrico

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PGC-1 α : coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

PRRs: receptores de reconhecimento de padrões

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

TLRs: receptores do tipo *Toll*

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

Wada: Agencia Mundial Antidoping

LISTA DE PUBLICAÇÕES RELACIONADAS A TESE

ROBERTA DE PAULA MARTINS; CHAI K LIM; KARINA GHISONI; ANANDA STAATS; KARINE DALLAGNOL; ALEXANDRE SOLANO; GILLES GUILLEMIN; ADERBAL SILVA AGUIAR JR. AND ALEXANDRA LATINI. **Treating depression with exercise: The inflammasome inhibition perspective.** Journal of Systems and Integrative Neuroscience, 3, 01-08, 2016.

ALEXANDRE FRANCISCO SOLANO; DÉBORA DA L DA LUZ SCHEFFER; ANA CRISTINA DE BEM ALVES; ADERBAL SILVA AGUIAR JR. AND ALEXANDRA LATINI. **Potential pitfalls when investigating the ergogenic effects of caffeine in mice.** Journal of Systems and Integrative Neuroscience, 3, 01-04, 2017.

LEONARDO BARROS; TUANY EICHWALD; ALEXANDRE FRANCISCO SOLANO; DÉBORA DA LUZ SCHEFFER; RODRIGO AUGUSTO DA SILVA; JOANA M. GASPAR AND ALEXANDRA LATINI. **Epigenetic modifications induced by exercise: Drug-free intervention to improve cognitive deficits associated with Obesity.** Physiology & Behavior, 24, 309-323, 2019.

ANA CRISTINA DE BEM ALVES; VIVIANE JOSE' DE OLIVEIRA BRISTOT; MIRIELI DENARDI LIMANA; ANA ELISA SPECK; LEONARDO SOARES DE BARROS; ALEXANDRE FRANCISCO SOLANO AND ADERBAL S. AGUIAR, JR. **Role of Adenosine A_{2A} Receptors in the Central Fatigue of Neurodegenerative Diseases,** 9, 145-156, 2019.

OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

SANDRA AMATRIAIN-FERNÁNDEZ; THOMAS GRONWALD; ERIC MURILLO-RODRÍGUEZ; CLAUDIO IMPERATORI; ALEXANDRE FRANCISCO SOLANO; ALEXANDRA LATINI AND HENNING BUDDE. **Physical Exercise Potentials Against Viral Diseases Like COVID-19 in the Elderly**. *Frontiers in Medicine*, 7, 01-05, 2020.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Cafeína – Consumo, absorção, farmacocinética e depuração	12
1.2 Cafeína: Farmacodinâmica	13
1.3 Cafeína: Agente ergogênico	16
1.3.1 Cafeína: Efeito sobre o sistema nervoso central.....	18
1.3.2 Cafeína: Efeito sobre o músculo esquelético.	20
1.3.3 Cafeína e exercício: efeitos sobre a ativação da proteína cinase dependente de AMP	21
1.4 Cafeína: Exercício físico e resposta inflamatória.....	23
1.4.1 Exercício Físico e Resposta Inflamatória	23
1.4.2 Cafeína e resposta inflamatória	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais.....	30
3.2 Procedimento e análise.....	30
3.3 Teste incremental máximo em esteira rolante	31
3.4 Preparação das amostras para análise.....	32
3.5 Tratamento com a cafeína	32
3.6 Determinação das concentrações de cafeína no plasma e em tecidos	32
3.7 Determinação da concentração de proteínas totais.....	33
3.8 Análise de proteínas por <i>Western Blott</i>	33
3.9 Análise Estatística	34
4. RESULTADOS	35
4.1 A cafeína acumulou nos tecidos responsáveis pela execução da atividade	35
4.2 A cafeína promoveu efeitos ergogênicos em animais jovens e adultos	37
4.3 Quantificação do desempenho físico em animais submetidos a um teste de esforço máximo em esteira.....	39
4.4 O efeito ergogênico da cafeína não envolveu aumento da sinalização mediada pela AMPK no músculo esquelético.....	41
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	47
7. MATERIAIS E MÉTODOS	48

7.1. Animais.....	48
7.2 Procedimento e análises	48
7.3 Desenho experimental	49
7.4 Extração de ácido ribonucleico (RNA) total	50
7.5 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	50
7.6 Quantificação da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (q-PCR).....	51
7.7 Obtenção do DNA.....	52
7.8 Tratamento do DNA	53
7.9 Determinação do padrão de metilação.....	54
7.10 Análise estatística.....	54
8. RESULTADOS	55
8.1 O pré-condicionamento com cafeína provocou uma resposta anti-inflamatória em quadríceps de animais expostos a LPS.....	55
8.2 O pré-condicionamento com cafeína inibe a ativação do inflamassoma em quadríceps de animais expostos a LPS.....	57
8.3 O pré-condicionamento com cafeína favorece a regulação positiva do gene que codifica para o receptor adenosinérgico <i>Adora_{2A}</i> no músculo quadríceps de animais submetidos a inflamação.....	59
8.4 Efeito do pré tratamento da cafeína e do LPS, no controle transcricional de genes relacionados a biogênese mitocondrial e metabolismo muscular	61
9. DISCUSSÃO	62
10. CONCLUSÃO	65
11. PERSPECTIVAS DO PRESENTE TRABALHO	66
REFERÊNCIAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cafeína – Consumo, absorção, farmacocinética e depuração

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina, peso molecular 194,2) é o composto psicoativo mais consumido no mundo; os consumidores habituais constituem 80 % ou mais da população (GILBERT, 1984). Após seu isolamento químico em 1819 e produção sintética em 1895, a cafeína também foi usada em vários medicamentos prescritos e sem receita (WALDVOGEL, 2003). A exemplo, a cafeína é combinada com uma variedade de medicamentos anti-inflamatórios não esteroides para amplificar a potência antinociceptiva e reduzir os efeitos colaterais (GRANADOS-SOTO; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, 1999). A cafeína também é usada sozinha para tratar condições como dores de cabeça, depressão respiratória em neonatos, hipotensão pós-prandial e obesidade (SAWYNOK, 1995). A cafeína é utilizada por via venosa na forma de citrato de cafeína como estimulante do sistema nervoso central (SNC) no tratamento de neonatos prematuros, em associação a benzoato de sódio para tratamento da cefaleia e, associada a anti-inflamatórios (GOLDSTEIN et al., 2006; SCHMIDT et al., 2006)

A cafeína pode ser extraída de mais de 60 espécies de plantas e encontra-se presente em diversos alimentos. As principais fontes de cafeína são: café, refrigerantes, bebidas energéticas, carboidratos em gel, chocolates e outras bebidas esportivas, além de diferentes formas farmacêuticas. O café é a infusão contendo cafeína mais consumida, onde sua concentração pode variar conforme o modo de preparo (**Tabela 1**) (HARLAND, 2000).

Tabela 1- Conteúdo de cafeína em diversas bebidas

Produto	Volume	Cafeína	Cafeína em 100 mL
Café expresso	60 mL	70 mg	117 mg
Café instantâneo	150 mL	66 mg	44 mg
Café filtrado	150 mL	74 mg	49 mg
Chá verde	240 mL	30 mg	13 mg
Coca Cola	350 mL	46 mg	13 mg
Chimarrão	150 mL	25 mg	17 mg

Fonte: Adaptado de Harland F. Barbara (HARLAND, 2000).

A cafeína é um composto farmacologicamente ativo de rápida absorção e com vários efeitos na maioria dos tecidos e órgãos do corpo: gastrointestinal, cardiovascular, SNC, renal, muscular e respiratório (BENOWITZ, 1990; JAMES, 2011; LEONARD; WATSON; MOHS, 1987). A cafeína administrada pela via oral, em humanos, é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e sua absorção completa se dá cerca de 60 min após sua ingestão. A constante de velocidade de absorção da cafeína é influenciada pelas propriedades físico-químicas da formulação e da dose. Por exemplo, a absorção da cafeína é mais rápida numa goma de mascar do que numa cápsula, ou no café (BONATI et al., 1982; KAMIMORI et al., 2002). Sua ligação a proteínas plasmáticas, principalmente à albumina, é de 10 % a 35 % e o volume de distribuição é de 0,6-0,7 L.kg⁻¹ (SAWYNOK; YAKSH, 1993). É importante ressaltar que uma taxa mais rápida de absorção desse fármaco, pode resultar em efeitos mais precoces, mas não necessariamente de maior magnitude. Após a ingestão oral crescente de 50 a 200 mg, as concentrações plasmáticas de cafeína aumentam de forma dose-dependente (KAMIMORI et al., 2002). Existe uma relação linear entre a dose de cafeína e o pico de concentração plasmática para doses do composto variando de 1 a 10 mg/kg (BONATI et al., 1982).

Quando administrada agudamente, a cafeína, pode induzir hipertensão, arritmias, aumento dos níveis plasmáticos de catecolamina, aumento da produção de urina, secreção de ácido gástrico e alterações no humor e nos padrões de sono (BENOWITZ, 1990; JAMES, 2011; LEONARD; WATSON; MOHS, 1987). Contudo, ainda não existe uma clara evidência de que o consumo exagerado de cafeína cause algum risco significativo para a saúde em indivíduos saudáveis, pois ainda que a cafeína aumente o metabolismo lipídico e a função endotelial, como proposto, os relatos ainda são contraditórios sobre se ocorre ou não aumento do risco de doença coronariana (TAVARES; SAKATA, 2012). Estas discrepâncias estão, principalmente, relacionadas à grande variabilidade da concentração plasmática atingida da cafeína em diversos indivíduos após a administração de uma dose idêntica do composto (GRAHAM; GRAHAM; SPRIET, 1995; SKINNER et al., 2010). A presença de determinados polimorfismos genéticos, a ativação ou inibição metabólica do citocromo P450 1A2 (CYP1A2), o sexo, o peso corporal, e a existência de hepatopatia são alguns dos fatores que determinam a variabilidade na farmacocinética da cafeína (SAWYNOK, 2011).

A excreção da cafeína em humanos se dá predominante pela urina com uma cinética de eliminação do tipo Michaelis-Menten seguindo uma cinética de primeira ordem através do CYP1A2 hepático (GU et al., 1992; PURI; HEARD; MONRO, 2020). O CYP1A2 metaboliza a cafeína majoritariamente (em torno de 95 %) por desmetilação transformando-a em paraxantina (85 %), teobromina (10 %) e teofilina (5 %). O remanescente da cafeína é metabolizada pelo CYP1A2 em monoxantinas (SAWYNOK; YAKSH, 1993). A meia-vida de eliminação da cafeína é de aproximadamente três a cinco horas, sendo a paraxantina o metabólito dominante em humanos. A paraxantina aumenta no plasma em concentrações dez vezes maiores que as da teofilina ou da teobromina, e permanece aumentado no plasma após oito a dez horas da uma ingestão da cafeína (SAWYNOK; YAKSH, 1993).

A cafeína é também excretada inalterada na urina de humanos e de roedores em baixos percentuais (2 % a 5 % da dose de cafeína administrada). A baixa excreção da cafeína na urina é explicada pela quase completa reabsorção (98 %) no túbulo renal. (HECKMAN; WEIL; GONZALEZ DE MEJIA, 2010).

Apesar do fato de a cafeína estar presente nas dietas da maioria das pessoas, mesmo não sendo considerada um nutriente essencial e nem necessária para preservar a saúde, sua ingestão no intuito de melhorar o desempenho atlético tem levado a incluir o fármaco nas dietas (APPLEGATE, 1999).

A intoxicação pela cafeína ocorre raramente, sendo os consumidores que utilizam a substância em excesso, e os que possuem maior sensibilidade, os mais vulneráveis aos seus efeitos. Dentre estes efeitos, podemos citar insônia, nervosismo, irritabilidade, dependência, ansiedade, taquicardia, sensação de zumbido no ouvido, distúrbios visuais parecendo faíscas no ar, dores de cabeça, cansaço, incapacidade de concentração (causada também por interrupção repentina da substância), prejuízo na memória, tensão muscular crônica (tremor, trepidez e palpitações), náuseas e desconforto gastrointestinal, podendo este último ser agravado caso o indivíduo já apresente tendência para úlcera ou gastrite, devido ao aumento da secreção gástrica provocada pela substância (CAPPELLETTI et al., 2018). Em alguns casos, pode resultar até mesmo em sangramento gastrointestinal, sendo as concentrações sanguíneas de 80 a 100 mg/L de cafeína consideradas letais para humanos, que poderiam ser alcançadas com a ingestão de, aproximadamente, 10 gramas de cafeína o que corresponderia a cerca de 200 cafés expressos fortes (CAPPELLETTI et

al., 2018). Como outros efeitos colaterais, podemos citar ainda o aumento da temperatura corporal, devido ao seu efeito termogênico e em razão da inibição do hormônio antidiurético; a cafeína aumenta a diurese resultando no balanço eletrolítico negativo com potencialização da excreção de cálcio e magnésio da urina, pode ocorrer a desidratação durante uma competição prejudicando o desempenho do participante (GRAHAM; HIBBERT; SATHASIVAM, 1998; GREER; MCLEAN; GRAHAM, 1998).

A ingestão de uma xícara de café expresso, equivalente a 70 mg/cafeína, produz picos de concentração plasmática de 5 a 10 $\mu\text{mol/L}$ de cafeína (CARRILLO; BENITEZ, 2000). As doses de cafeína empregadas com objetivos ergogênicos, melhoria de desempenho, podem variar entre 3 a 9 mg/kg de massa corporal (STEAR et al., 2010). Estas doses, em seres humanos, induzem concentrações plasmáticas de cafeína entre 20 e 70 $\mu\text{mol/L}$ (**Figura 1**), com uma meia vida útil entre 2,5-10 h. (GRAHAM; GRAHAM; SPRIET, 1995; SOEREN; GRAHAM, 1998). Sendo uma dose oral de 6 mg/kg muito utilizada e reconhecida na literatura por melhorar a capacidade física e o desempenho cognitivo em seres humanos (CONNELL et al., 2016; STEAR et al., 2010; TALLIS et al., 2012).

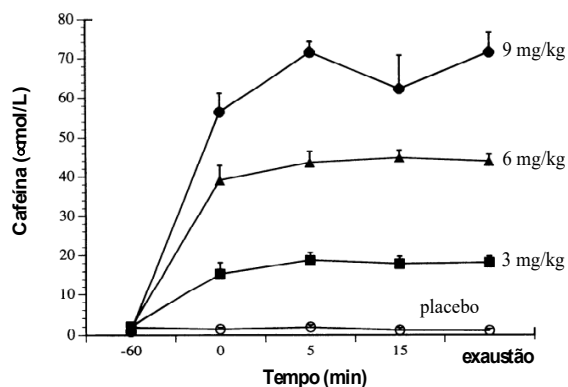


Figura 1: Concentração de cafeína plasmática durante exercício até a exaustão.

Os participantes ingeriram cafeína em diferentes doses de 3 a 9 mg/kg. Posteriormente as concentrações plasmáticas do fármaco foram mensuradas. Figura adaptada (GRAHAM; GRAHAM; SPRIET, 1995).

1.2 Cafeína: Farmacodinâmica

A cafeína é um fármaco antagonista competitivo e não seletivo dos receptores de adenosina. A ação farmacológica da cafeína consiste no bloqueio dos receptores purinérgicos (FREDHOLM, 1980).

Existem quatro tipos de receptores purinérgicos, denominados A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, os quais são diferentes quanto a afinidade pela adenosina e pela cafeína, estruturas moleculares, distribuição tecidual e perfil farmacológico (BOREA et al., 2018; FREDHOLM et al., 2011). Os receptores A₁ e A_{2A} apresentam alta afinidade pela adenosina, enquanto os receptores A_{2B} e A₃ são de baixa afinidade (RIBEIRO; SEBASTIÃO; DE MENDONÇA, 2003).

A adenosina é um nucleotídeo presente nos meios intra e extracelular, constituído de adenina e ribose. A adenosina possui sua disponibilidade controlada, devido ao papel neuromodulador que exerce (CUNHA, 2001; LATINI; PEDATA, 2001). A adenosina após ligar se ao seu receptor, promove a excitação ou inibição de diferentes neurônios, modulando seus neurotransmissores (dopamina, acetilcolina, serotonina, GABA entre outros). Por exemplo, no estriado a ativação do receptor A_{2A}, leva a uma inibição da liberação de GABA. O metabolismo da adenosina é regulado, principalmente, através da hidrólise dos nucleotídeos de adenina (trifosfato/difosfato/monofosfato de adenosina) e alterações na concentração intracelular de adenosina influenciam sua concentração extracelular, devido a presença de transportadores bidirecionais específicos para a adenosina (FREDHOLM et al., 2005; LATINI; PEDATA, 2001).

Dentre os receptores adenosinérgico, os receptores A₁ possuem uma grande afinidade com a cafeína, exibem a maior abundância no SNC e com alta densidade no córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, tálamo, tronco cerebral e medula espinhal (FREDHOLM et al., 1999, 2011). Adicionalmente, este receptor é amplamente expresso em tecidos periféricos tais como, vasos deferentes, testículos, tecido adiposo, estômago, rins, hipófise, adrenais, coração, aorta, fígado, olhos e bexiga (RALEVIC, V; BURNSTOCK, 1998). A ativação dos receptores adenosinérgicos do tipo A₁ promove efeitos inibitórios mediados pela ativação da proteína G inibitória (G_i) que reduz as concentrações de AMPc, inibindo as vias dependentes desta molécula sinalizadora (FREISSMUTH; SELZER; SCHUTZ, 1991; LONDOS; COOPER; WOLFF, 1980).

Por outro lado, os receptores A_{2A} que, também possuem alta afinidade com a cafeína, apresentam sua distribuição bastante restrita no SNC, ocorrendo no estriado, *núcleo accumbens* e tubérculo olfatório (FREDHOLM et al., 1999). Sua ocorrência nos tecidos periféricos inclui células do sistema imune, olhos, músculo esquelético, coração, útero, bexiga, plaquetas e células do sistema endoteliais (DIXON et al., 1996; ONGINI; FREDHOLM, 1996). A ativação dos receptores adenosinérgicos do tipo A_{2A} , desencadeia uma resposta antagonista àquela dos receptores do tipo A_1 , visto que o receptor está associado a uma proteína G estimulatória (G_s), a qual proporciona o aumento dos níveis intracelulares de AMPc (KESSEY; MOGUL, 1998). Sua co localização com os receptores dopaminérgicos D_2/D_3 , no estriado, formando heterodímeros, é crucial na modulação da função motora (CANALS et al., 2003; FUXE et al., 2003; VOLKOW et al., 2015)

Os receptores A_{2B} apresentam uma baixa afinidade pela cafeína (FREDHOLM et al., 1999) e baixa densidade no SNC, nos pulmões, vasos deferentes e hipófise (GESSI et al., 2005; REES; SCANLON; HAM, 2003; ZHONG et al., 2005). Uma alta densidade deste receptor é encontrada no intestino grosso e bexiga (YAAR et al., 2005). Assim como os receptores A_{2A} , os receptores A_{2B} são acoplados a proteína G_s , promovendo o aumento dos níveis de AMPc (BRUNDEGE; DUNWIDDIE, 1997).

O subtipo de receptores A_3 , foram os últimos receptores adenosinérgicos descritos e, apresentam uma baixa afinidade pela cafeína (FREDHOLM et al., 1999). No cérebro, são encontrados em densidade moderada no cerebelo e hipocampo e com baixa densidade no restante do cérebro (FREDHOLM et al., 2005). Outros órgãos, tais como, testículos, fígado, útero, pulmões, rins, placenta, coração, bexiga e baço também expressam os receptores A_3 e a sua ativação inibe a produção de AMPc (RALEVIC, V; BURNSTOCK, 1998).

Tabela 2- Receptores de adenosina humanos

Receptores	Gene Humano	Proteína G	Localização
Receptor de adenosina A ₁	<i>ADORA1</i>	G _{i,o}	Distribuição ampla: alta nos nervos, coração, rim e tecido adiposo.
Receptor de adenosina A _{2A}	<i>ADORA2A</i>	G _{s/olf}	Distribuição ampla: muito alto nos gânglios da base; alto nos nervos, vasos sanguíneos e células imunológicas.
Receptor de adenosina A _{2B}	<i>ADORA2B</i>	G _s	Distribuição ampla, mas abundância geralmente baixa.
Receptor de adenosina A ₃	<i>ADORA3</i>	G _{i/o}	Distribuição restrita, variando em diferentes espécies: alto em mastócitos.

Fonte: Adaptado de Jiang-Fan Chen *et. al.* (CHEN; ELTZSCHIG; FREDHOLM, 2013).

A adenosina através de vasodilatação, via dependente da síntese de óxido nítrico contribui para o aumento do fluxo sanguíneo muscular, proporcionando o suprimento adequado de oxigênio e nutrientes essenciais para a contração muscular (HELLSTEN *et al.*, 1998). Assim, a adenosina produzida pela musculatura esquelética a partir do AMP no sarcoplasma e no espaço intersticial do músculo durante as contrações, atua como um 'hormônio local', ligando-se aos receptores de adenosina presentes na membrana de células adjacentes. Desta forma, a adenosina intersticial pode contribuir, significativamente, tanto para a regulação do metabolismo dos carboidratos musculares, quanto pelo ajuste do fluxo sanguíneo local em resposta às necessidades energéticas impostas por um determinado grau de atividade contrátil da célula muscular (HESPEL; RICHTER, 1998).

Estudos imuno histoquímicos realizados em músculo esquelético humano, detectou que os três dos quatro tipos de receptores de adenosina estavam localizados em células vasculares que perfundem o tecido muscular esquelético. Entretanto, apenas os receptores A_{2A} e A_{2B} foram observados na membrana plasmática e no citosol do músculo esquelético, sendo a marcação citoplasmática do subtipo A_{2A}, ligeiramente mais intensa nas fibras do tipo I do músculo, enquanto que a marcação do subtipo A_{2B}, estava quase ausente nestas fibras (LYNGE; HELLSTEN, 2000). Cabe ressaltar ainda, que em modelo *in vivo* o tratamento com agonistas seletivos do receptor A₁ promoveu o aumento da

captação de glicose pelo músculo esquelético quando estimulado pela insulina ou pela contração muscular, demonstrando, assim, a participação da adenosina no controle do metabolismo muscular (CHALLISS; RICHARDS; BUDOHOSKI, 1992; DERAIVE; HESPEL, 1999). Por outro lado, a ativação dos receptores A_1 pela adenosina, diminui a liberação do neurotransmissor acetilcolina na junção neuromuscular e, como consequência, a inibição da entrada de Ca^{2+} (SILINSKY, 2004). Já a ativação dos receptores A_{2A} , facilita a liberação de acetilcolina das terminações nervosas motoras por meio da mobilização alternativa dos reservatórios de Ca^{2+} (CORREIA-DE-SÁ; TIMÓTEO; RIBEIRO, 2000).

1.3 Cafeína: Agente ergogênico

O homem sempre buscou meios extrínsecos para melhorar o desempenho atlético, além das vantagens conferidas pelo treinamento sistemático e dotação genética favorável. Tentativas de melhorar o desempenho não é novidade. Os antigos atletas olímpicos gregos comiam cogumelos, pois acreditavam que ajudaria a alcançar a vitória nas competições. Essa busca sem fim é impulsionada, principalmente, pela natureza cada vez mais competitiva dos esportes que tanto alimenta, quanto é alimentada pelo desejo de atletas por uma melhora do desempenho.

O campo de ajudas ergogênicas se expandiu tremendamente nos últimos anos. A palavra ergogênico é derivada das palavras gregas: *ergo* (trabalho) e *gen* (produção). Assim, o intuito da utilização de ergogênicos é aumentar o desempenho físico, prevenindo ou retardando a fadiga (MAGKOS; KAVOURAS, 2005).

O número e os tipos de fármacos e substâncias usadas para melhorar o desempenho na segunda metade do século XIX aumentaram, em linha com o desenvolvimento da farmacologia e medicina. Os estimulantes foram usados, principalmente, como auxiliares ergogênicos para melhorar a capacidade de trabalho muscular, enquanto os efeitos anabólicos de substâncias que mais tarde foram classificadas como hormônios começaram a ser reconhecidos. A cafeína foi a principal substância utilizada neste período para aumentar o estado de alerta. As bebidas alcoólicas,

também foram consideradas úteis como auxiliares de alívio do estresse. Como não existiam regras proibindo tais substâncias, os atletas não tentaram disfarçar e, por isso, há bons registros de *doping* nesta época. Os treinadores, também desenvolveram suas próprias receitas de *doping*, usando combinações de vários estimulantes, como comprimidos de estircnina, misturas de conhaque e cocaína (HOLT; EROTOKRITOU-MULLIGAN; SÖNKSEN, 2009). Embora, alguns fármacos, ou substâncias possam, de fato, produzir alguns resultados e melhorar o desempenho físico, sob certas circunstâncias, seu uso é estritamente regulamentado e eles estão proibidos nos esportes (MOTTRAM, 1999). Além disso, o *doping* por tais meios geralmente carrega um alto risco de efeitos adversos à saúde (AHRENDT, 2001).

Neste contexto, a cafeína, devido à sua segurança, popularidade e, atualmente, não ser considerada *doping*, tornou-se um recurso ergogênico muito utilizado no meio esportivo (COLE et al., 1996; GRAHAM-PAULSON et al., 2016). Os efeitos ergogênicos da cafeína melhorando o desempenho físico foram verificados em diversas modalidades esportivas, tais como: a corrida (ARAÚJO et al., 2017; CARR et al., 2008), o ciclismo (CONNELL et al., 2016; GREEN et al., 2017), o remo, em *sprints* realizados por atletas de diferentes modalidade (SCHNEIKER et al., 2006), nas artes marciais (SANTOS et al., 2014), entre outras.

No início da década de 80 a cafeína foi incluída na lista de substâncias proibidas do Comitê Olímpico Internacional (COI) com valor limítrofe de 15 µg/mL de cafeína na urina para caso positivo de *doping*. Contudo, em 1984, o COI reduziu o valor limítrofe de 15 para 12 µg/mL de cafeína na urina para caso positivo de *doping*, valor este correspondente à ingestão de uma dose de cafeína de 5- 6 mg/kg de massa corporal; cerca de 8 xícaras (60 mL) de cafés expressos (HARLAND, 2000). Em janeiro de 2004, a cafeína foi retirada da lista de substâncias proibidas e incluída junto a outras substâncias em um programa de monitoramento da Agência Mundial Antidoping (WADA) e mantém-se até os dias atuais (WADA; 2021). Desde então, seu efeito ergogênico legalmente permitido, tem despertado grande atenção de atletas e técnicos (SÖKMEN et al., 2008; VAN THUYNE; DELBEKE, 2006). Assim, os efeitos da cafeína no desempenho esportivo humano continuam a ser uma área de pesquisa de importante relevância (GANIO et al., 2009).

Em relação a pesquisa, geralmente, é difícil conseguir uma grande amostra de atletas de elite para rigor estatístico, ou para impor as condições e/ou técnicas invasivas de pesquisa sobre seus cronogramas de treinamento e competição. Portanto, a maioria dos estudos de cafeína e desempenho esportivo foram realizados em atletas de recreação a níveis altamente treinados, mas sub elite (BURKE, 2014). Cabe ressaltar, que estas limitações para testar os efeitos induzidos pela cafeína no desempenho de atletas de elite podem ser melhor controladas ao utilizar modelos *in vivo* e *in vitro* que possibilitem investigar seus efeitos em músculos isolados como também determinar a dose mais efetiva (HIGGINS; STRAIGHT; LEWIS, 2016; SOUTHWARD; RUTHERFURD-MARKWICK; ALI, 2018). As doses de cafeína empregadas com objetivos ergogênicos, em humanos, podem variar entre 3 a 9 mg/kg de massa corporal, de acordo com a sensibilidade de cada indivíduo (STEAR et al., 2010).

Alguns estudos, mostram que os efeitos da cafeína nas doses entre 3 a 9 mg/kg de massa corporal, são expressivos em atletas submetidos a testes de exaustão e com características contínuas (ciclismo, natação, remo), de curta duração e com tempo inferior a 5 min; aumentando a potência e diminuindo o tempo de execução e percepção de esforço (ASTORINO; ROBERSON, 2010; GANIO et al., 2009). Outros estudos, realizados em exercício máximo e de curta duração, não tem encontrado resultados ergogênico na potência máxima que pudesse ser atribuído ao uso de cafeína (FERREIRA et al., 2019; GREER; MCLEAN; GRAHAM, 1998).

Os mecanismos moleculares envolvidos no efeito ergogênico da cafeína estão sendo pesquisados. Devido a capacidade da cafeína em atravessar a barreira hematoencefálica e as membranas celulares em concentrações sanguíneas geradas por uma dose ergogênica, e por causa de suas propriedades farmacológicas, têm sido proposto que o SNC e os músculos sejam os principais locais de ação para promover os efeitos ergogênicos (MEEUSEN; ROELANDS; SPRIET, 2013; TALLIS et al., 2012).

1.3.1 Cafeína: Efeito sobre o sistema nervoso central

No SNC, a cafeína tem como principal efeito farmacológico, contrabalançar a neuromodulação inibitória da adenosina, a fim de induzir efeitos que reduzam a fadiga central durante o exercício (CONNELL et al., 2016; KALMAR; CAFARELLI, 2004). Assim, há um consenso crescente de que o principal mecanismo de ação da cafeína, seja modulando o SNC durante as atividades locomotoras, com evidências em humanos (CONNELL et al., 2016; ELMENHORST et al., 2012) e em modelos animais (AGUIAR et al., 2020; DAVIS et al., 2003; EL YACOUBI et al., 2000). Esses modelos, apoiam a capacidade da cafeína de agir como um antagonista dos receptores A₁ e A_{2A} de adenosina, resultando numa melhora do desempenho.

A fadiga que se origina no SNC pode estar relacionada a perturbações na síntese e no metabolismo de vários neurotransmissores (FOLEY; FLESHNER, 2008; MEEUSEN et al., 1996; SWART et al., 2009; WATSON et al., 2005). Implicando que o fenômeno da fadiga central pode ser comum aos sistemas oculomotor e locomotor; foi investigado, em humanos, a fadiga central no sistema oculomotor após exercício físico prolongado. Assim, os movimentos sacádicos dos olhos foram medidos após 11 ciclistas consumirem placebo ou cafeína durante 180 min de ciclismo estacionário. O exercício diminuiu a velocidade das sacadas dos olhos em 8 % (ensaio com placebo). Este efeito foi revertido pela cafeína, em que a velocidade dos movimentos sacádicos foi aumentado em 11 % após o exercício. O sistema oculomotor humano é prejudicado por exercício extenuante do aparelho locomotor. E a cafeína exerce um efeito protetor no controle oculomotor, que pode estar relacionado à neurotransmissão central regulada positivamente (CONNELL et al., 2016).

Ao investigar o receptor A_{2A}, como um possível mecanismo ergogênico por meio farmacológico e genético; camundongos nocaute global e no pro-encéfalo para o receptor A_{2A}, após administração de cafeína, realizaram um teste de exercício incremental de esforço na esteira. Os animais que receberam a cafeína, aumentaram o $\dot{V}O_{2max}$ e a potência de corrida, mostrando que o antagonismo do receptor A_{2A} é ergogênico. Além disso, os efeitos ergogênicos da cafeína foram revogados em camundongos nocautes para receptor A_{2A} globais e do pro encéfalo, mostrando que o antagonismo de receptor A_{2A}, em neurônios do pro encéfalo é responsável pela ação ergogênica da cafeína (AGUIAR et al., 2020). Isso, fornece uma demonstração direta do envolvimento neuronal do receptor A_{2A} nos efeitos ergogênicos da cafeína, como já sugerido por dois estudos, que mostram

que o NECA (um agonista farmacológico de receptor adenosinérgico), preveniu os efeitos ergogênicos da cafeína em ratos (DAVIS et al., 2003) e, inversamente, a administração de cafeína reverteu o desempenho insatisfatório da corrida de ratos tratados com NECA (CONNELL et al., 2016). Portanto, a literatura aponta para os receptores de adenosina serem cruciais para os efeitos ergogênicos da cafeína.

1.3.2 Cafeína: Efeito sobre o músculo esquelético.

As evidências que indicam que a cafeína pode induzir a contratilidade do músculo remonta a 1910 (VELEY, V. H., 1910). Foi descrito que a cafeína teria um efeito direto nas propriedades contráteis do músculo esquelético em humanos (LOPES et al., 1983).

Estudos pioneiros, *in vitro*, demonstraram que a cafeína induziu a contração muscular em preparações de anfíbios (tartarugas e sapos), mesmo na ausência de Ca^{2+} extracelular e sem modificar o potencial de membrana (AXELSSON; THESLEFF, 1958; CONWAY; SAKAI, 1960). Este efeito, foi posteriormente confirmado em músculo esquelético de rato exposto a 20 mM de cafeína e foi associado a um aumento de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e a um aumento da sensibilidade das miofibrilas ao Ca^{2+} , sendo as fibras de contração lenta (tipo I) mais sensíveis à ação da cafeína do que as de contração rápida (tipo II) (PAGALA; TAYLOR, 1998). O aumento da liberação de Ca^{2+} , foi mediado pela ativação do canal de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Esse canal de liberação de Ca^{2+} , é uma grande estrutura oligomérica formada por quatro receptores de rianodina (ROUSSEAU et al., 1988).

Em contraste, com as concentrações milimolares de cafeína usadas durante estudos farmacológicos *in vitro*; as concentrações plasmáticas de cafeína em humanos são normalmente inferiores a 70 $\mu\text{mol/L}$ (GRAHAM, 2001; GRAHAM; GRAHAM; SPRIET, 1995). Desta forma, objetivando indicar os prováveis efeitos diretos da cafeína em qualquer atividade músculo esquelética com melhorias agudas na força e potência muscular; foi demonstrado, *in vitro*, que os mesmos níveis micromolares de cafeína alcançados no plasma sanguíneo humano, acarretou em um pequeno, porém, significativo, aumento na força e potência em fibras isoladas do músculo extensor longo dos dedos de ratos (JAMES et al., 2005). Nesse estudo, as preparações musculares foram

submetidas a mudanças cíclicas de comprimento de onda sinusoidal com condições de estimulação elétrica otimizadas para produzir o máximo de trabalho. Utilizando a mesma metodologia acima citada, porém em concentrações de 50 e 70 $\mu\text{mol/L}$, a cafeína aumentou a potência dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de camundongos (TALLIS et al., 2012).

A suplementação com cafeína na dose de 6 mg/kg de massa corporal provocou uma melhora na função neuromuscular durante o exercício dinâmico máximo em 14 homens jovens (BAZZUCCHI et al., 2011). Esses pesquisadores utilizaram uma combinação de parâmetros mecânicos e eletromiográficos, para demonstrar um efeito positivo da cafeína na ativação neuromuscular do músculo flexor do cotovelo durante contrações isocinéticas máxima. A curva torque velocidade angular foi aumentada após a suplementação com cafeína. Isso, foi associado a uma maior velocidade de propagação do potencial de ação ao longo das fibras musculares (8,7 %), o que sustenta a hipótese de um efeito da cafeína no recrutamento muscular. Além disso, contrações eletricamente estimuladas (contração única), também foram avaliadas nos mesmos sujeitos para descrever efeitos centrais e periféricos da suplementação de cafeína na função neuromuscular. Esses achados reforçam que o efeito da cafeína é tanto central quanto periférico (BAZZUCCHI et al., 2011).

Seguindo essa linha de raciocínio, a cafeína aumenta a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e o recrutamento de unidades motoras, o que pode resultar em uma contração muscular mais forte. Esses efeitos poderiam ajudar a explicar alguns dos efeitos ergogênicos da cafeína sobre o desempenho físico em humanos (BAZZUCCHI et al., 2011; TARNOPOLSKY, 2008a).

1.3.3 Cafeína e exercício: efeitos sobre a ativação da proteína cinase dependente de AMP

A proteína cinase ativada por AMP (AMPK), é uma proteína heterodímera, composta por três subunidades, uma catalítica, α , e duas regulatórias, β e γ , pertencente à família das serina/treonina cinase. Expressa em todos os organismos eucarióticos, trata-se de uma cinase conservada evolutivamente com uma importante função moduladora do

nível energético celular, onde fisiologicamente integra sinais nutricionais e hormonais, regulando a sobrevivência celular e as vias metabólicas relacionadas ao crescimento, afim de preservar os níveis de ATP intracelular (HARDIE; SAKAMOTO, 2006). A redução nas concentrações de glicose, ou o aumento de AMP, desencadeiam a fosforilação da treonina 172 da subunidade α , catalítica, estimulando a ativação da cinase (ANDRIS; LEO, 2015; BLAGIH et al., 2015). Em nível celular, a AMPK é ativada em contextos metabólicos que diminuam o ATP e aumentem AMP como, por exemplo; exercício, hipóxia, inflamação, sepse e privação de glicose. Já, em nível de organismo, sua atividade enzimática é também, controlada por citocinas, como leptina (MINOKOSHI et al., 2002), interleucina 6 (IL-6) (RUDERMAN et al., 2006) e adiponectina (YAMAUCHI et al., 2002).

Em resposta a administração da cafeína, a AMPK tem sido considerada como um intermediário de sinalização envolvido na ativação do transporte de glicose independente de insulina em músculo esqueléticos (EGAWA et al., 2009; JENSEN et al., 2007). Neste contexto, a incubação de preparados de músculo esquelético de roedores, com 3 mM de cafeína, por 15 min, promoveu um aumento da atividade da AMPK e da captação de glicose, independente. Mecanicamente, os autores propuseram que a cafeína aumentou a liberação do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático ativando a calmodulina, e subsequentemente, a proteína cinase dependente de Ca^{2+} calmodulina (EGAWA et al., 2009; JENSEN et al., 2007).

Fisiologicamente, após a contração do músculo esquelético, concentrações celulares de AMP e ADP e níveis de Ca^{2+} aumentam. O Ca^{2+} promove a fosforilação da treonina 172 na subunidade α da AMPK, pela proteína cinase dependente de Ca^{2+} calmodulina (MOUNIER et al., 2015). Assim, o exercício aumenta a fosforilação da AMPK e a sua atividade de maneira dependente da intensidade no músculo esquelético (EGAN et al., 2010; WOJTASZEWSKI et al., 2000). A ativação de AMPK induzida pelo exercício físico no músculo esquelético, suprime a síntese de glicogênio e síntese de proteínas, mas promove o transporte de glicose, a oxidação de ácidos graxos e induz a biogênese mitocondrial (HERZIG; SHAW, 2018; QUIRÓS; MOTTIS; AUWERX, 2016). A biogênese mitocondrial ocorre através do crescimento e divisão de mitocôndrias pré-existentes. Novo material é adicionado a rede mitocondrial existente, a fim de aumentar massa mitocondrial (HERZIG; SHAW, 2018). A AMPK induz a biogênese

mitocondrial por fosforilação e ativação direta do coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PGC-1 α) (JÄER et al., 2007). A superexpressão do PGC-1 α , leva a um aumento na mitocôndria funcional, melhoria do VO_{2max}, e uma mudança da utilização de carboidrato para gordura como combustíveis durante exercício submáximo e consequente melhora no desempenho (CALVO et al., 2008).

Os efeitos metabólicos da cafeína associados ao desempenho físico, têm sido relacionados, principalmente, ao aumento da lipólise, oxidação de ácidos graxos, gasto de energia através da estimulação do sistema nervoso simpático e preservação de glicogênio muscular (ACHESON et al., 2004; BUTCHER; BAIRD; SUTHERLAND, 1968; CRUZ et al., 2015; RANEY; TURCOTTE, 2008).

O efeito aditivo da cafeína e do exercício físico sobre a AMPK, propõe que a cafeína aumenta a captação de glicose durante o exercício físico, por aumentar a atividade de AMPK com consequente captação de glicose independente de insulina. Isso teria como consequência, um aumento da disponibilidade de substrato energético, sem comprometer os estoques de glicogênio muscular retardando o aparecimento da fadiga durante o exercício (TSUDA et al., 2015).

1.4 Cafeína: Exercício físico e resposta inflamatória

1.4.1 Exercício Físico e Resposta Inflamatória

A inflamação é um mecanismo de defesa básico ativada contra agentes patogênicos, células danificadas ou irritantes. A resposta inflamatória atende a uma variedade de propósitos fisiológicos, como defesa do hospedeiro, resposta de reparo tecidual e recuperação do estado homeostático. No entanto, essa resposta ativada de forma persistente gera consequências patológicas que levam ao dano tecidual, metaplasia e uma mudança nos pontos de ajuste homeostáticos (MEDZHITOV, 2008). Portanto, o corpo requer uma regulação adequada das respostas inflamatórias.

Existem dois tipos de inflamação, aguda e crônica. A inflamação aguda é uma resposta biológica complexa dos tecidos vasculares a estímulos prejudiciais, como

patógenos, células danificadas ou irritantes. As respostas inflamatórias agudas causam dor, calor, coceira, inchaço e vermelhidão. Uma resposta inflamatória aguda disfuncional pode causar vários problemas sérios. Além disso, a inflamação crônica é uma causa de câncer, alergias, asma e diabetes. Portanto, há uma necessidade importante de métodos eficazes para regular a inflamação. Fatores-chave mediados por inflamação, fator nuclear kappa- β (NF- κ B) e proteína cinase ativada por mitogênio (MAPK), são moléculas de sinalização importantes na via do receptor *Toll-like* (TLR) (PEAKE et al., 2015).

A regulação desses fatores é amplamente reconhecida como uma boa estratégia para suprimir vários tipos de inflamação (HSIEH et al., 2011; RAHMAN; FAZAL, 2011).

Está bem documentado os benefícios que o exercício físico promove na saúde das pessoas. Parte dos benefícios promovidos pela prática regular do exercício físico é atribuído ao seu potencial em modular o perfil, parcialmente, através da resposta inflamatória na fase aguda [para revisão ver (SCHEFFER; LATINI, 2020)].

As citocinas são mediadores importantes de vários aspectos da saúde e doença, incluindo apetite, glicose e metabolismo dos lipídios, sensibilidade à insulina, hipertrofia e atrofia do músculo esquelético. Durante a última década, uma atenção considerável se concentrou no potencial do exercício físico regular em neutralizar uma série de estados de doença, modulando a produção de citocinas. O exercício de resistência estimula aumentos moderados a grandes nas concentrações circulantes de interleucinas 6 (IL6), 8 (IL-8), 1 β (IL-1 β), 10 (IL10), antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1RA) (PEAKE et al., 2015). Portanto, o exercício físico promove a síntese de citocinas. Estas, por sua vez, agem de forma semelhante aos hormônios, mediando o metabolismo no músculo esquelético, no fígado, no tecido adiposo e promovendo a angiogênese (PEDERSEN, 2011). Essas citocinas liberadas pelos músculos, decorrentes do exercício físico, promovem, também a regeneração e modelação tecidual, e o controle da resposta inflamatória sistêmica e metabólica (PEAKE et al., 2015).

As citocinas têm sido amplamente investigadas como potenciais biomarcadores, em diferentes cenários envolvendo o treinamento físico, devido à sua capacidade de regular a função imune e o quadro inflamatório em resposta ao exercício físico, tanto para promoção de saúde, como para melhora do desempenho esportivo. O uso dessas informações melhora a capacidade do treinador, ou atleta em avaliar o período de

recuperação após uma sessão de exercícios e de estabelecer a intensidade das sessões de treinamento subsequentes (BESSA et al., 2016; GLEESON et al., 2011; SMITH, 2000).

Estudos tem demonstrado que uma única sessão de treinamento intervalado de *sprint* (TIS), afeta a dinâmica entre as concentrações entre as IL-6, IL-10 e do TNF- α , que retornam aos níveis basais em até 24h após o exercício (HARNISH; SABO, 2016; KASPAR et al., 2016). Por outro lado, repetidas sessões de TIS podem promover o aumento das concentrações plasmática da IL-6 e TNF- α ; tardiamente e concomitante redução na concentração de IL-10. Neste cenário, o aumento tardio nos níveis das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e o TNF- α , e aumento na razão entre IL6/IL-10, poderia resultar em quadro de imunossupressão e fadiga crônica (BESSA et al., 2016; RICHARDSON et al., 2016)

No caso da pratica de exercício prolongado (mais de 2,5 h), sabemos que o músculo esquelético pode aumentar em mais de 100 vezes os níveis circulantes de IL-6 (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). Aumentos, menos expressivos, têm sido relatados com exercícios de menor duração (FISCHER, 2006).

O aumento de IL-6 durante o exercício é transitório, normalmente retornando aos níveis de repouso dentro de 1 h após o exercício (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). Frente a estes dados, podemos sugerir que a concentração de IL-6 responde de forma tempo dependente a pratica do exercício. É importante ressaltar, que o aumento transitório da IL-6 circulante durante o exercício, parece ser responsável por um aumento subsequente dos níveis circulantes das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e do IL-1RA e pela liberação de cortisol da glândula adrenal (STEENSBERG et al., 2003). Assim, como o aumento nas concentrações circulantes de citocinas e a magnitude das elevações do nível de cortisol, o aumento da adrenalina plasmática, também, está relacionada à intensidade e duração do exercício físico (KRAEMER; RATAMESS, 2005). O cortisol é conhecido por ter efeitos anti-inflamatórios potentes e as catecolaminas de aumentar a IL-10 e regular negativamente a produção de citocinas, TNF α e IL-1 β , induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) (BERGMANN et al., 1999).

Os possíveis mecanismos pelos quais o exercício exerce seu efeito anti inflamatório incluem: liberação de IL-6 na circulação a partir da contração das fibras musculares e subsequentes aumentos nos níveis circulantes de IL-10 e de IL-1RA; aumento do número circulante de células T reguladoras secretoras de IL-

10; regulação negativa da expressão do TLR em monócitos e inibição de respostas (tais como: produção de citocina pró-inflamatória, apresentação de antígeno e expressão de molécula coestimuladora), redução no número circulante de monócitos pró-inflamatórios (**Figura 2**) (GLEESON et al., 2011).

Tendo em mente esta dinâmica, é importante ressaltar que o desequilíbrio na homeostase tecidual e um aumento crônico nos níveis plasmáticos de citocinas como a IL-6 e o TNF α , bem como a redução dos níveis de IL-10 podem estar associados com o dano muscular, a fadiga crônica e o declínio do desempenho, um quadro conhecido como *overtraining* (SMITH, 2000), sendo de grande relevância qualquer recurso capaz de reduzir os níveis IL-6 e TNF- α e aumentar as concentrações de IL-10. Fato este, que poderia favorecer a resposta anti-inflamatória após o exercício, como também contribuir para uma recuperação mais rápida do atleta (TAULER et al., 2013, 2016).

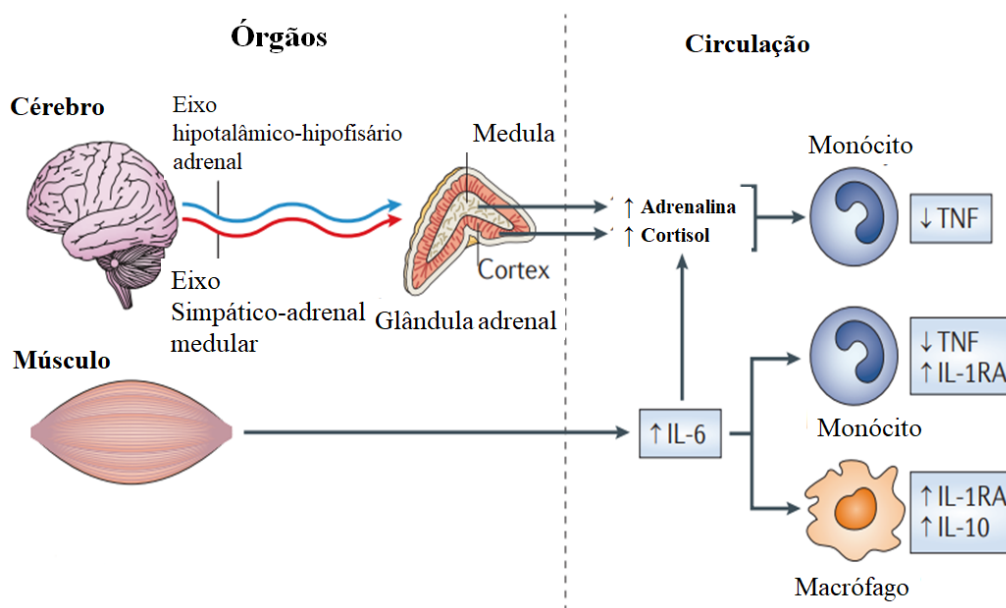


Figura 2: Potenciais mecanismos que contribuem para os efeitos anti-inflamatórios promovido pelo exercício físico.

A ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e do sistema nervoso simpático (SNS) leva à liberação de cortisol e adrenalina do córtex adrenal e medula, respectivamente. Esses hormônios inibem a liberação do fator de necrose tumoral (TNF) pelos monócitos. A IL-6 produzida pela contração do músculo esquelético, também diminui a produção de TNF pelos monócitos e pode estimular a liberação de cortisol. Elevações agudas em IL-6 estimulam a liberação de antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) de monócitos e

macrófagos, aumentando assim as concentrações circulantes dessa citocina anti-inflamatória. Figura adaptada (GLEESON et al., 2011).

Nesse contexto, a literatura vem demonstrando que a cafeína parece agir como um ótimo recurso modulador do quadro inflamatório (CECHELLA et al., 2014; HWANG et al., 2016; TAULER et al., 2013). Como será descrito abaixo.

1.4.2 Cafeína e resposta inflamatória

Em relação ao efeito da cafeína frente a resposta inflamatória, recentemente foi sugerido que a ingestão de cafeína pode atuar sinergicamente com o exercício sobre a resposta de citocinas (CECHELLA et al., 2014; ROSSI et al., 2017; TAULER et al., 2013; WALKER et al., 2008). A ingestão de cafeína, favorece a produção de IL-6 após o exercício de corrida de 15 km (TAULER et al., 2013, 2016). Após a suplementação com cafeína (6 mg/kg) em atletas que realizaram uma prova de corrida de 15 km, foi observado um aumento na circulação de leucócitos e neutrófilos. Os níveis de adrenalina, glicose e lactato, também aumentaram após a corrida. Assim como, aumentos plasmáticos significativos de IL-6 e IL-10. A magnitude desses aumentos em IL-6 foi de ~271 % no grupo que recebeu cafeína e de 111 % na condição placebo. Nos níveis plasmáticos de IL-10, este aumento foi superior no grupo cafeína com 161 % de aumento comparado com 77 % no grupo placebo (TAULER et al., 2013). Esse aumento inicial, pode estar diretamente relacionado a liberação da IL-10 pelos leucócitos e consequente inibição da produção de IL-6 e TNF- α pelo mecanismo de retroalimentação negativa, exercendo assim um efeito anti-inflamatório após o exercício (STEENSBERG et al., 2003).

Em um estudo utilizando um modelo *in vitro* e um *in vivo*, a cafeína inibiu a produção de óxido nítrico, induzido por lipopolissacarídeo (LPS) no peixe-zebra. No modelo *in vitro*, a cafeína inibiu as respostas inflamatórias induzidas por LPS em células RAW264.7 por regular negativamente a ativação de NF- κ B e a fosforilação de MAPK (HWANG et al., 2016). Esses resultados sugerem, ainda, que a cafeína pode servir como um composto bioativo natural com efeitos anti-inflamatórios e pode ser um agente útil

para o tratamento de doenças associadas à inflamação (HWANG et al., 2016). Em outro estudo, onde investigou o efeito da exposição *in vitro* à cafeína, 100 $\mu\text{mol/L}$, na produção de citocinas estimulada por LPS no sangue humano total. Além disso, também demonstraram que a cafeína suprimiu, consistentemente a produção da citocina TNF- α , e que este efeito é mediado pela via da proteína cinase dependente de AMPc (HORRIGAN; KELLY; CONNOR, 2004).

A ativação do inflamassoma NLRP3 funciona como uma plataforma supramolecular para a maturação dependente da caspase-1 e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (BENETTI et al., 2013; GUO; CALLAWAY; TING, 2015). Tem sido proposto que tanto IL-1 β quanto IL-18 exercem um papel crucial na iniciação e progressão de distúrbios inflamatórios no tecido muscular esquelético. Há evidências de que os componentes do complexo inflamassoma são regulados positivamente no músculo humano, sugerindo que o músculo esquelético participa ativamente da ativação do inflamassoma (RAWAT et al., 2010). Este é um ponto crucial, pois, mesmo sabendo que as células do músculo esquelético produzem e liberam citocinas que podem agir de forma autócrina, parácrina e / ou endócrina, modulando o metabolismo e o processo inflamatório (HOFFMANN; WEIGERT, 2017), ainda não se conta com claras informações sobre o efeito da cafeína na ativação do inflamassoma em modelos *in vivo*. Um único estudo investigou os efeitos da cafeína na ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos induzidos por LPS. Esse estudo, demonstrou que a cafeína reduziu, significativamente, a expressão de NLRP3 ao suprimir sinalização MAPK /NF- $\kappa\beta$. E, que, o silenciamento do receptor A_{2A} de adenosina, antagonizado por cafeína, reduziu a expressão da caspase-1 clivada em macrófagos, pela redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ZHAO et al., 2019). Portanto, é objeto de interesse a relação da cafeína na regulação do inflamassoma, bem como o seu desfecho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os mecanismos moleculares envolvidos no efeito ergogênico da cafeína em modelo animal.

2.2 Objetivos específicos

Capítulo I

- 1) Demonstrar o efeito ergogênico da cafeína em camundongos C57BL/6, adultos, machos submetidos a um teste incremental máximo em esteira rolante;
- 2) Determinar a possível contribuição da idade na resposta no efeito ergogênico da cafeína em camundongos C57BL/6, adultos, machos submetidos a um teste incremental máximo em esteira rolante;
- 3) Determinar a farmacocinética da cafeína em camundongos C57BL/6, adultos machos, em repouso e submetidos a atividade física;
- 4) Quantificar o conteúdo de AMPK e AMPK-p em músculo esquelético de camundongos C57BL/6, adultos, machos submetidos a exercício físico.

Capítulo II

- 1) Analisar o efeito da administração aguda de cafeína sobre marcadores inflamatórios no músculo esquelético após 24 h de administração de LPS, em camundongos suíços adultos machos;
- 2) Avaliar o efeito do pré-tratamento da cafeína na expressão gênica dos receptores de adenosina dos tipos A₁ e A_{2A} no músculo esquelético após 24 h de administração de LPS, em camundongos suíços adultos machos;

- 3) Avaliar o efeito do pré-tratamento da cafeína na regulação do inflamassoma no músculo esquelético após 24 h de administração de LPS, em camundongos suíços adultos machos;
- 4) Avaliar o efeito do pré-tratamento da cafeína no controle transcricional de genes relacionados a biogênese mitocondrial e metabolismo muscular no músculo esquelético, após 24 h de administração de LPS, em camundongos suíços adultos machos;

CAPITULO I:

EFEITO DA CAFEÍNA NO DESEMPENHO FISICO EM ROEDORES

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos C57BL/6 adultos machos obtidos do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais permaneceram em caixas plásticas coletivas (38 x 31 x 17 cm.), sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas, numa temperatura ambiental de, aproximadamente, $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com acesso livre a água e ração para roedores (Nuvital, PR, Brasil). Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (PP00934/CEUA) da UFSC.

3.2 Procedimento e análise

Tanto a experimentação, quanto as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, LABOX, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. O teste de esforço físico (teste incremental máximo) utilizou-se o espaço físico do Laboratório de Doenças Neurodegenerativas, coordenado pelo professor Dr. Rui Daniel S. Prediger do

Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. E, as mensurações de lactato sanguíneo foi mensurado em analisador específico YSL 2700 (*YSL 2700, Yellow Springs, CA, USA*), alocado no Laboratório de Esforço Físico, Centro de Desportos, UFSC, coordenado pelo professor Dr. Luiz Guilherme A. Guglielmo.

3.3 Teste incremental máximo em esteira rolante

O teste, no período matutino, teve início 30 min após os animais receberem salina ou uma dose de cafeína (6 mg/kg) intraperitoneal (i.p.). O teste iniciou com uma velocidade de 16 m/min, com 8 % de inclinação. A velocidade foi incrementada em 3 m/min a cada 3 min, até a exaustão voluntária do animal (DAVIS et al., 2009; SCHEFFER et al., 2019). Após atingir a exaustão, 25µL de sangue foram coletados com um capilar heparinizado através da realização de um pequeno corte na porção distal da cauda do animal. O sangue foi empregado para a mensuração das concentrações de lactato. Para isso, o sangue foi colocado em tubos plásticos contendo 50 µL de fluoreto de sódio 1 % com o intuito de inibir a via glicolítica, e o lactato foi mensurado em analisador específico YSL 2700 (*YSL 2700, Yellow Springs, CA, USA*). O período de adaptação ocorreu, no período matutino, por 3 dias em esteira ergométrica a 16 m/min, sem inclinação, 10 min/dia. Depois, de 48 h, teve início o teste incremental de esforço como mostrado no esquema da Figura 3.

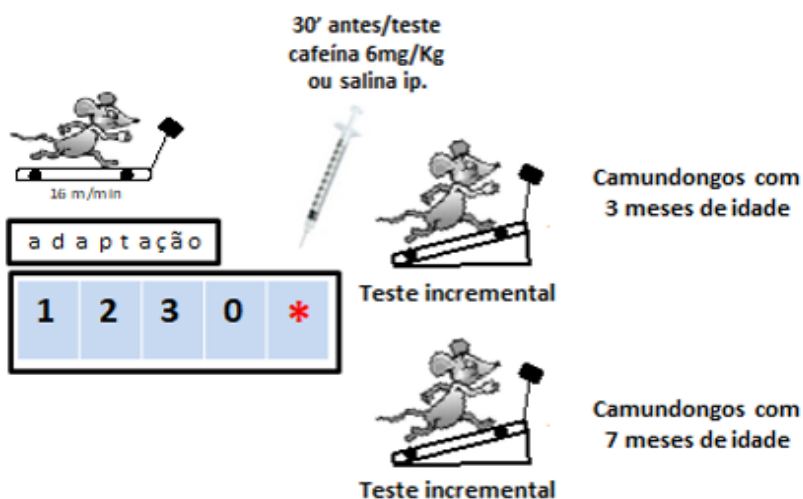


Figura 3: Representação gráfica do teste incremental máximo.

O teste teve início 30 min após os animais receberem salina ou uma dose única de cafeína (6 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). O teste incremental máximo iniciou com uma velocidade de 16 m/min, com 8% de inclinação, e a velocidade foi incrementada em 3m/min a cada 3 min.

3.4 Preparação das amostras para análise

Após a realização dos testes, os animais sofreram eutanásia por deslocamento cervical seguido de decapitação e amostras de sangue foram coletadas. O cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) e os principais músculos requeridos durante a corrida; quadríceps (glicolítico/oxidativo) e tibial anterior (glicolítico), foram rapidamente dissecados e separados. Os tecidos foram armazenados em ultra freezer a – 80 °C até a análise, ou homogeneizados em tampão adequado para processamento imediato.

3.5 Tratamento com a cafeína

Para todos os experimentos, a dose de cafeína selecionada (6 mg/kg), foi baseada a partir da literatura, sendo considerada ergogênica e sem apresentar reações adversas.

A cafeína (C0750; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi diluída em cloreto de sódio 0,9% (salina; veículo) em um volume de injeção de 0,1 mL/10 g. Os animais, controle, receberam igual volume de veículo.

3.6 Determinação das concentrações de cafeína no plasma e em tecidos

A concentração de cafeína foi determinada em fluídos biológicos, tecido muscular e cerebral mediante o uso de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) acoplada a um detector de matriz de fotodiodo (Alliance e2695, Waters, Milford, MA, EUA). A metodologia foi baseada em determinações prévias do nosso grupo (SCHEFFER et al., 2019).

3.7 Determinação da concentração de proteínas totais

O conteúdo de proteico das amostras foi mensurado empregando o método de Lowry (LOWRY et al., 1951) utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.8 Análise de proteínas por *Western Blott*

O quadríceps foi homogeneizado em cinco volumes (1:5, v/v) de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 a 1%, glicerol a 10% e coquetel inibidor de protease [Sigma]). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, durante 10 min, a 4°C e o sobrenadante foi coletado e diluído em 1 volume (1:1, v/v) de tampão Tris 100 mM, pH 6,8 contendo EDTA 4 mM e SDS a 8%. Após, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos e o tampão de diluição (Tris 100 mM, com 40% de glicerol e azul de bromofenol, pH 6,8), numa proporção 25:100 (v/v), e β-mercaptoetanol (na concentração final de 8%), foram adicionados nas amostras.

As proteínas foram isoladas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poli-acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio [SDS]) utilizando gel de separação de acrilamida com concentração de 15% e gel de entrada a 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 150 mV durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência e transferidos para membranas de nitrocelulose usando um sistema semi-dry (1,2 mA/cm²; 1,5 h) como descrito por (STOTT, 1989). Para verificar a eficiência do processo de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S.

Após, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). A AMPK e AMPK fosforilada foi detectada após incubação overnight (4°C) com anticorpo específico para esta proteína diluído em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) na diluição de 1:1000 (Santa Cruz Technology). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário

anti-coelho (conjugado à peroxidase) e reveladas em filme radiográfico, após a emissão de quimiluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose (LumiGLO), de acordo com as recomendações do fabricante. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti-tubulina (1:2000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas foi aplicada no gel. Todos os passos de bloqueio e incubação foram seguidos por três lavagens (5 minutos) com TBS-T. As bandas imunorreativas foram quantificadas usando o software ImageLab®.

3.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média + erro padrão da média (EPM). A análise do teste de esforço máximo foi expressa em percentual de animais por etapa da tarefa e as curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de *Gehan-Breslow-Wilconxon*. No caso da análise das concentrações de lactato sanguíneo utilizou-se o teste *t* de *Student* para comparar os animais tratados com cafeína com seus respectivos controles. A análise estatística da farmacocinética da cafeína foi realizada através de análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *Tukey*. As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$ (IC=95%). As análises estatísticas e gráficos foram realizados através do programa GraphPad Prisma 6®.

4. RESULTADOS

4.1 A cafeína acumulou nos tecidos responsáveis pela execução da atividade

As **Figura 4 A-G** mostram as concentrações de cafeína no plasma, no músculo esquelético e no cérebro de camundongos que receberam uma única dose do fármaco (6 mg/kg; i.p.). A cafeína foi administrada em animais que se encontravam no repouso e em animais que foram submetidos a atividade física com prévia adaptação a esteira ergométrica (16 m/min; sem inclinação; 10 min/dia; 3 d) de acordo com o esquema apresentado na **Figura 4A**. A **Figura 3B** mostra que as concentrações plasmáticas da cafeína atingiram um pico 15 min após a administração de cafeína e que os níveis do fármaco foram maiores nos animais que permaneceram em repouso prévio à injeção. As **Figuras 4C-G** mostram que a distribuição sanguínea e tecidual do fármaco atinge um pico de concentração em 15 min. No entanto, a cafeína acumulada mostrou maiores níveis no sangue de animais que permanecerão no repouso prévio à administração (**Figura 4B**; cafeína ($\mu\text{mol/L}$): repouso=18,1; atividade= 15,1; $*P<0,05$), sem diferir no tempo de meia-vida para a eliminação do fármaco [tempo de meia-vida (min): repouso= 31,6; atividade= 33,5]. Um padrão invertido foi observado no músculo quadríceps (**Figura 4C**) e estriado (**Figura 4G**) dos camundongos que foram submetidos à atividade física com um tempo de meia-vida para eliminação da cafeína de aproximadamente [tempo de meia-vida (min): quadríceps= 45; estriado= 40]. As **Figuras 4B-G**, também mostram que a concentração da cafeína (pmol/mg de tecido) foi maior nos tecidos encefálicos (córtex pré-frontal= 2179; hipocampo= 485; estriado= 282) quando comparada ao tecido muscular esquelético (quadríceps= 756; tibial anterior= 264). Pode ainda ser observado nestas figuras que as maiores diferenças de concentração no pico da cafeína foram induzidas nos tecidos diretamente envolvidos na atividade física realizada em esteira, o quadríceps e o estriado (**Figuras 4C e 4G**; cafeína (pmol/mg): quadríceps repouso= 471; quadríceps atividade= 756; relação atividade/repouso= 1,60; estriado repouso= 511; estriado atividade= 282; relação atividade/repouso= 0,55).

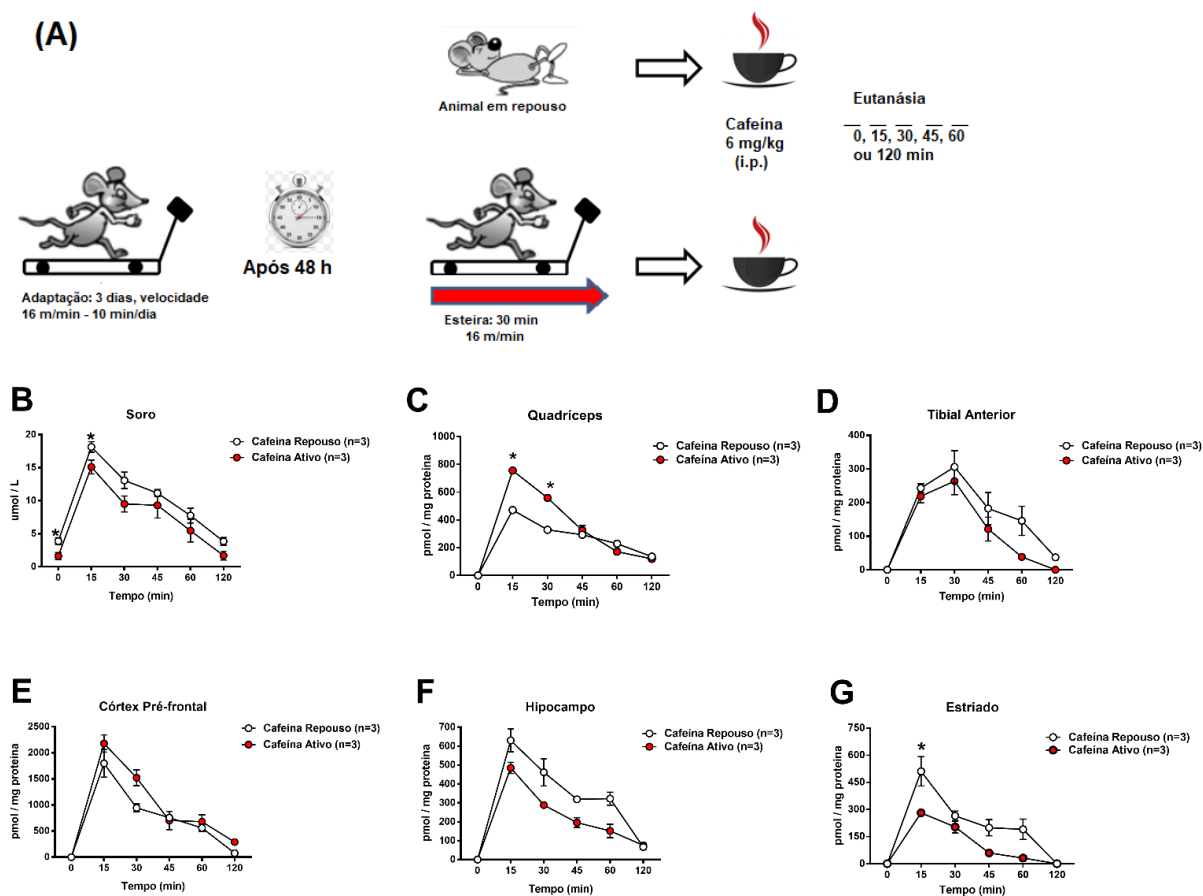


Figura 4: Distribuição da cafeína no sangue, nos músculos esqueléticos quadríceps e tibial anterior, e nas regiões cerebrais, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.

Camundongos C57BL/6 (3 meses de idade; machos; n=3) em repouso (círculos brancos) ou submetidos a 30 min de corrida em esteira a uma velocidade de 16 m/min (círculos vermelhos) receberam uma dose única de cafeína (6 mg/kg; i.p.). (A) Farmacocinética da cafeína no sangue (B), nos músculos esqueléticos, quadríceps (C) e tibial anterior (D), e nas regiões cerebrais, córtex pré-frontal (E), hipocampo (F) e estriado (G). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *Turkey*; * $P < 0,05$ (FRANCISCO SOLANO et al., 2017).

4.2 A cafeína promoveu efeitos ergogênicos em animais jovens e adultos

As **Figuras 5A-E** mostram o efeito de uma única dose de cafeína (6 mg/kg; i.p.) em animais que foram submetidos a um teste incremental de esforço (velocidade inicial= 16 m/min; 8 % de inclinação; incremento na velocidade até a exaustão= 3 m/min a cada 3 min) com prévia adaptação a esteira ergométrica (16 m/min; sem inclinação; 10 min/dia; 3 dias). As **Figuras 5B e 5D** mostram que os camundongos que receberam a cafeína permaneceram na esteira por mais tempo alcançando velocidades de corrida significativamente mais altas independentemente da idade (camundongos de 3 meses: salina= 40 m/min; cafeína= 43 m/min; camundongos de 7 meses: salina= 43 m/min; cafeína= 46 m/min), demonstrando assim o efeito ergogênico do composto no teste incremental de esforço ($P < 0,05$). Ainda, o melhor desempenho físico dos animais coincidiu com o aumento significativo nas concentrações sanguíneas de lactato no final da sessão (**Figuras 5C e 5E**), apontando a uma maior capacidade física destes animais em suportar exercício de alta intensidade.

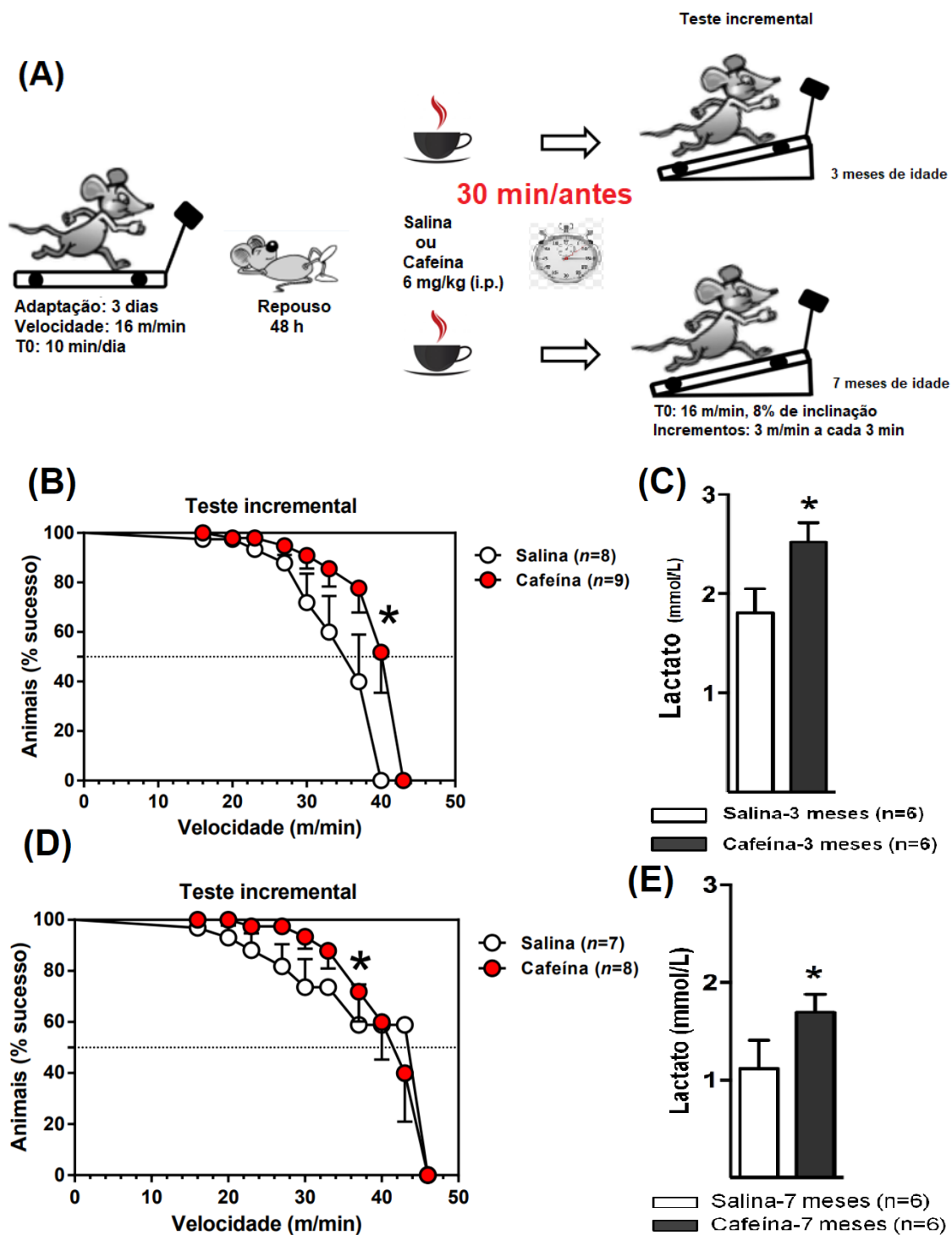


Figura 5: Efeito da administração da cafeína sobre o desempenho físico em animais submetidos a um teste de esforço máximo em esteira.

(A) Camundongos C57BL/6 (3 ou 7 meses de idade; machos; n=3) foram adaptados durante 3 dias em esteira ergométrica a uma velocidade de 16 m/min, sem inclinação, durante 10 min/dia. Depois de 48 h foi realizado um teste incremental de esforço. O efeito ergogênico da cafeína foi quantificado por meio de curvas de sobrevivência e pelos níveis de lactato sanguíneo ao final do protocolo em camundongos com 3 (B, C) e 7 (D, E) meses de idade. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. As curvas de

sobrevivência foram analisadas pelo teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon e níveis de lactato pelo teste de t de Student. * $P < 0,05$ (FRANCISCO SOLANO et al., 2017).

4.3 Quantificação do desempenho físico em animais submetidos a um teste de esforço máximo em esteira

Considerando que os roedores apresentaram uma distribuição rápida da cafeína no sangue e nos tecidos envolvidos na atividade física (**Figura 4**), os próximos experimentos, que tiveram o intuito de quantificar o efeito ergogênico da cafeína, foram iniciados exatamente 15 min após a injeção do fármaco. A **Figura 6A** mostra que para quantificar a maior capacidade física promovida pela cafeína os animais (3 meses) foram primeiramente submetidos a um teste incremental de esforço físico até a exaustão. O teste teve início 15 min após os animais receberem solução salina (veículo; i.p.). O teste incremental iniciou com uma velocidade inicial de 16 m/min, com 8 % de inclinação, e a velocidade foi incrementada em 3 m/min a cada 3 min até a exaustão voluntária (**dia 5** do protocolo experimental; condição **PRÉ**), prévia adaptação à atividade em esteira por 3 dias. A seguir, após um período de repouso e nova adaptação, os animais receberam uma dose de cafeína (6 mg/kg; i.p.) e 15 min depois foram submetidos a um segundo teste incremental de esforço físico até a exaustão (**dia 12** do protocolo experimental; condição **PÓS**). A **Figura 6B** mostra que os camundongos que receberam salina nos dois testes, não apresentaram diferença significativa, entre si, nos seus resultados (53 m/min). A **Figura 6C** mostra que os camundongos que receberam salina na condição pré teste alcançaram (43 m/min) em velocidades de corrida. E, esses mesmos animais, ao receberem cafeína na condição pré teste, permaneceram na esteira por mais tempo alcançando velocidades de corrida mais altas (53 m/min), demonstrando o efeito ergogênico do composto no teste incremental de esforço ($P < 0,001$).

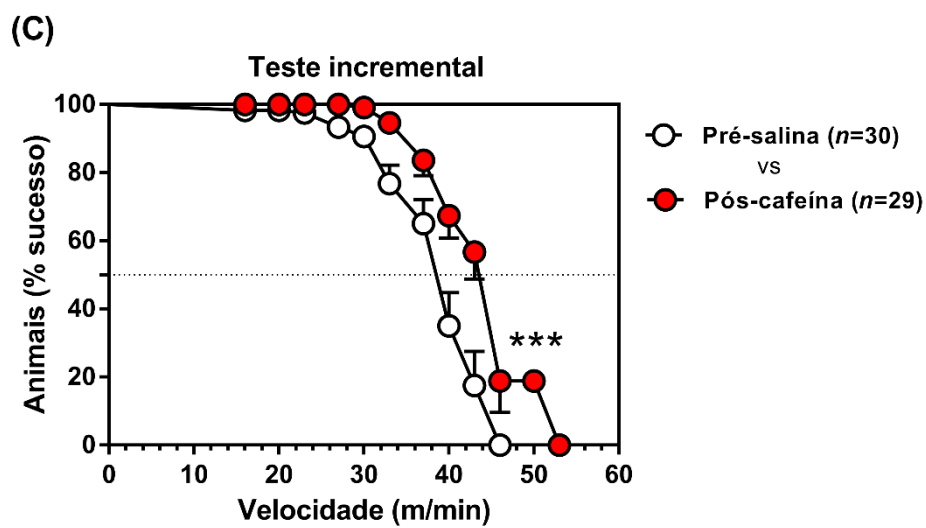
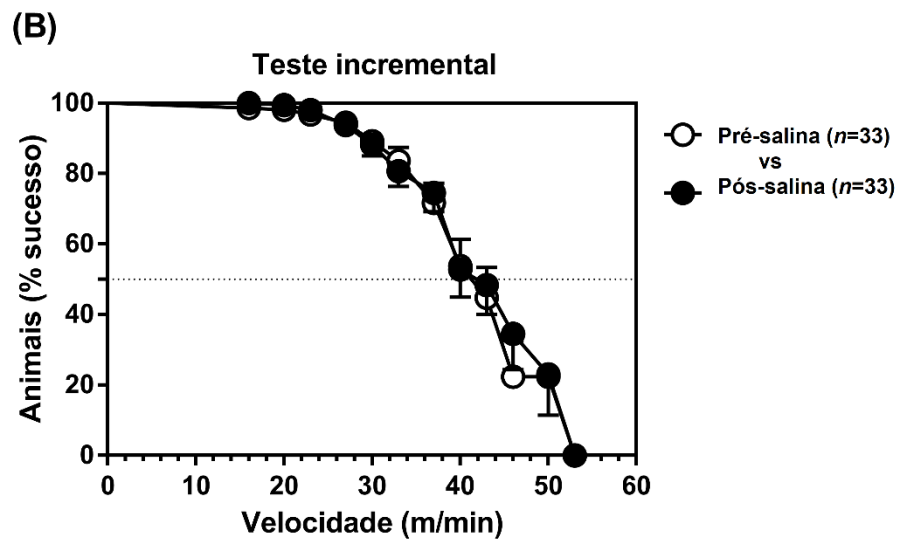
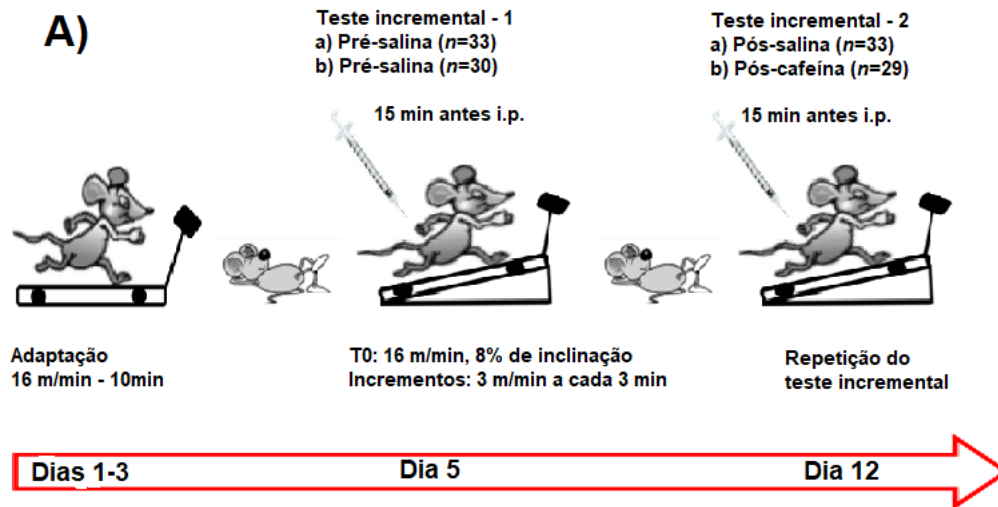


Figura 6: Quantificação do efeito ergogênico da cafeína.

(A) Camundongos C57BL/6 (3 meses de idade; machos; n=66) foram adaptados durante 3 dias em esteira ergométrica a uma velocidade de 16 m/min, sem inclinação, durante 10 min/dia. Depois de 48 h foi realizado um teste incremental de esforço. O teste teve início 15 min após os animais receberem solução salina (veículo; i.p.). O teste incremental iniciou com uma velocidade de 16 m/min, com 8 % de inclinação, e a velocidade foi incrementada em 3 m/min a cada 3 min até a exaustão. Um segundo teste de esforço foi realizado após um período de recuperação de 3 dias e de nova adaptação de 2 dias. Para o segundo teste de desempenho físico os animais foram divididos em dois grupos, um deles recebeu solução salina e o outro uma dose de cafeína (6 mg/kg; i.p.), e iniciaram o teste após 15 min de receberem os compostos. O efeito ergogênico da cafeína foi quantificado por meio de curvas de sobrevivência (B, C). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon, $*P < 0,001$.

4.4 O efeito ergogênico da cafeína não envolveu aumento da sinalização mediada pela AMPK no músculo esquelético

Para avaliar se os efeitos ergogênicos da cafeína estiveram vinculados a um aumento da fosforilação da AMPK, o qual corresponde a um dos mecanismos propostos para o aumento do desempenho físico induzido pelo fármaco. Utilizamos 16 animais, 8 dias, após terem sido submetidos ao protocolo descrito na **Figura 6A**. Esses animais, receberam uma dose adicional de cafeína e posteriormente os tecidos foram coletados para avaliar o grau de fosforilação da proteína.

A **Figura 7A** mostra que após o segundo teste incremental (**dia 12** do protocolo experimental), os animais permaneceram outro período de repouso (3 dias), foram submetidos a uma nova adaptação (2 dias) e, depois, de 48 h os animais receberam uma dose de cafeína (**dia 20** do protocolo experimental 6 mg/kg; i.p.). Os animais permaneceram durante 30 min em atividade física prévia a administração do fármaco. Os animais foram eutanasiados 15 min e 60 min após a injeção da cafeína e o quadríceps foi dissecado. As **Figuras 7B-E** mostram que o grau de fosforilação da proteína AMPK no resíduo de treonina 172 (AMPK^{Tre172}) não foi alterado pelo tratamento *in vivo* com o fármaco ergogênico no quadríceps, embora tenha sido observada uma redução significativa no conteúdo de AMPK após 15 min de administração de cafeína (**Figura 7B**; $t_{(4)} = 2,93$, $P < 0,05$). As imagens apresentadas na **Figura 7E** correspondem às bandas eletroforéticas da AMPK e AMPK^{Tre172} e da proteína β -tubulina usada como controle interno de carga proteica.

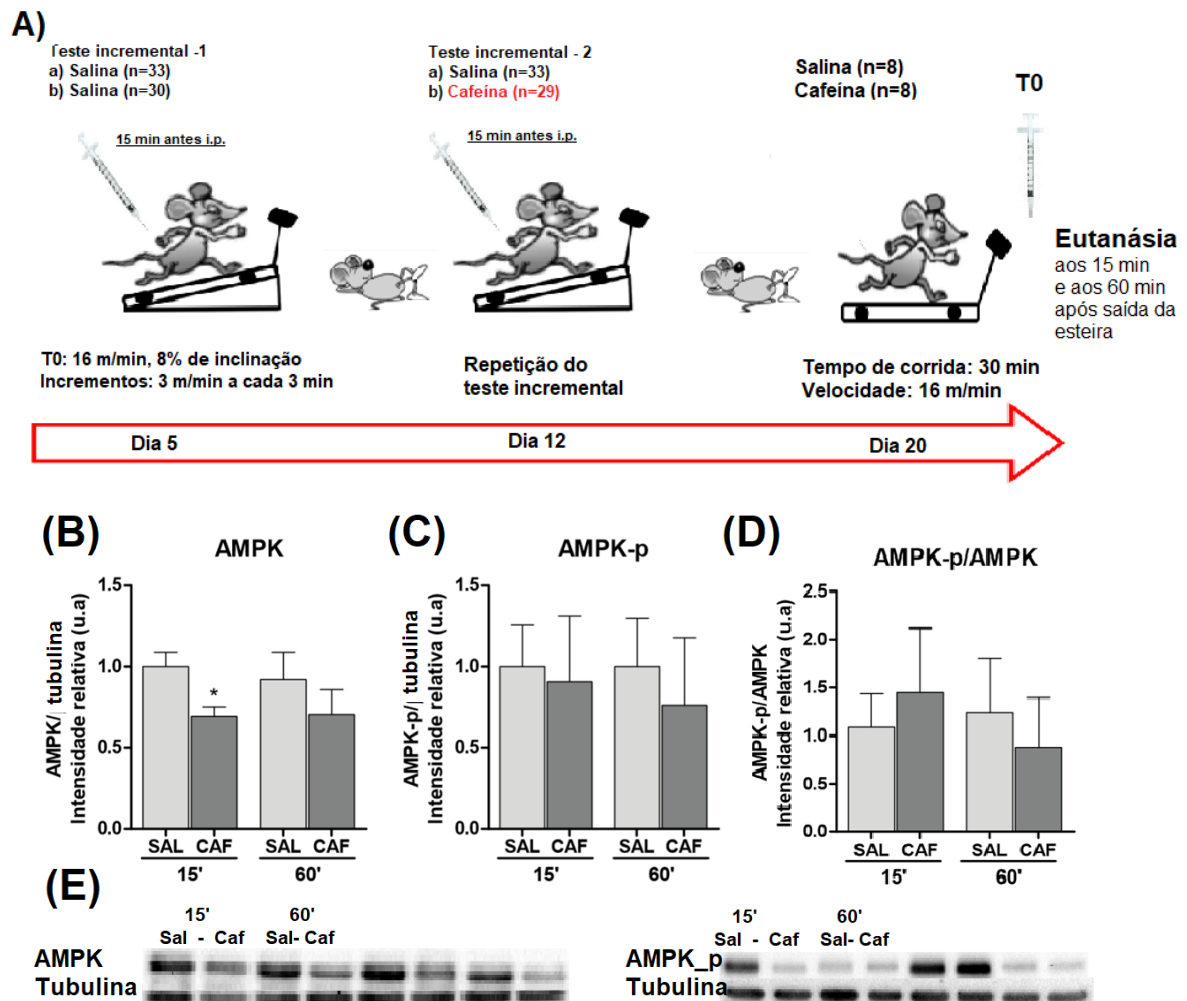


Figura 7: Grau de fosforilação da proteína cinase dependente de AMP (AMPK) em animais submetidos a teste de esforço máximo e à administração de cafeína.

(A) Camundongos C57BL/6 (3 meses de idade; machos; n=16) após terem sido submetidos ao protocolo experimental descrito na Figura 6, permaneceram por outro período de repouso (3 dias) e nova adaptação (2 dias). No dia 20 do protocolo experimental, os animais permaneceram durante 30 min em atividade física prévia a administração da cafeína. Os animais foram eutanasiados 15 min e 60 min após a injeção do fármaco e o quadríceps foi dissecado. (B-D) Conteúdo relativo da AMPK total e da AMPK fosforilada no resíduo de treonina 172 (AMPK^{Tre172}) no quadríceps dos animais submetidos ao protocolo experimental. (E) As imagens correspondem bandas eletroforéticas da AMPK e AMPK^{Tre172} e da proteína b-tubulina usada como controle interno de carga proteica. Os pesos moleculares da AMPK e da b-tubulina estão indicados como 62 kDa e 50 kDa, respectivamente. As barras representam a média \pm erro padrão da média. Teste *t*, Student, não pareado, $*P < 0,05$, indica diferença entre os grupos salina vs. cafeína 15 min.

5. DISCUSSÃO

Neste *capítulo 1* foi confirmado o efeito ergogênico de uma dose de cafeína considerada moderada em humanos (6 mg/kg), bem como, descrita pela primeira vez a farmacocinética do composto em camundongos C57BL/6.

O delineamento de vários modelos experimentais teve o intuito de tentar entender melhor o efeito envolvido na capacidade da cafeína em modular positivamente o desempenho físico, para assim poder ser projetado em humanos.

Demonstramos que a cafeína administrada 30 min antes do início do exercício aumentou significativamente o desempenho no teste de esforço máximo realizado em esteira por camundongos adultos (3 meses de idade) e velhos (7 meses de idade). Em adição ao melhor desempenho físico (distância e velocidade), os camundongos que receberam a cafeína apresentaram níveis mais elevados de lactato sanguíneo, fato este, que demonstra uma maior capacidade física de sustentar o exercício. Estes resultados corroboram com diferentes trabalhos da literatura que relataram o efeito ergogênico da cafeína principalmente durante a realização de exercícios de exaustão (ASTORINO; ROBERSON, 2010; GANIO et al., 2009; HIGGINS; STRAIGHT; LEWIS, 2016). Na literatura, existem relatos que tanto a absorção como o metabolismo da cafeína podem sofrer influência de diferentes fatores, entre eles a idade, o que poderia impactar em seu efeito ergogênico (NEHLIG, 2018). Contudo, em nosso modelo experimental a diferença de idade não promoveu diferenças significativas na melhora no desempenho físico entre os animais de 3 e 7 meses de idade. Possivelmente, não ter incluído animais mais velhos no desenho experimental, pode ser considerado um limitante desta pesquisa. Cabe, ainda ressaltar que, para melhor comparação com os humanos, os camundongos foram testados na esteira após 30 min de administração da cafeína, por via i.p. Este período, foi escolhido com base em estudos que demonstraram ser o pico sanguíneo da cafeína em humanos (BONATI et al., 1982; KAMIMORI et al., 2002). Por outro lado, o efeito ergogênico observado em ambos os grupos de animais tratados com cafeína foram modestos, 7%, quando comparados ao efeito observado em humanos, 11,3% (DE ARAUJO BONETTI DE POLI et al., 2016). Frente a isso, foi questionado se a cinética e pico sanguíneo da cafeína seriam similares aos dados já descrito para humanos. Como mostrado na **Figuras**

4, a distribuição do fármaco no sangue e diferentes tecidos apresentou um perfil cinético muito similar. Por exemplo, o pico sanguíneo foi observado aos 15 min, de uma a duas vezes mais curto que o pico de concentração descrita em humanos (BONATI et al., 1982; KAMIMORI et al., 2002). Ainda, as concentrações atingidas no sangue foram de 18,1 $\mu\text{mol/L}$, três vezes menor do que descrita em humanos (BONATI et al., 1982; KAMIMORI et al., 2002). Foi também identificado que a ativação do sistema simpático, pela exposição do animal à esteira [a atividade físico ativa o sistema simpático (CHRISTENSEN; GALBO, 1983)] prévio à administração de cafeína, provocou uma modificação na concentração máxima do fármaco atingida em tecidos chaves relacionados com a atividade física, como o quadríceps e o estriado (quadríceps aumentou 60 % - estriado diminuiu 55 %) e uma alteração no tempo de vida média da cafeína (quadríceps diminuiu 33 % - estriado aumentou 10 %). Acreditamos que as maiores concentrações de cafeína observada no quadríceps dos animais que realizaram atividade física, possa estar relacionada com o melhor desempenho físico observados. Sabendo que a cafeína pode aumentar a disponibilidade de Ca^{2+} pela liberação do retículo sarcoplasmático e auxiliar no recrutamento de unidades motoras, influenciando na sensibilidade das miofibrilas ao Ca^{2+} durante a prática de exercício (BAZZUCCHI et al., 2011; TARNOPOLSKY, 2008a, 2008b). Considerando que o estriado é uma estrutura envolvida no controle motor e que apresenta alta expressão dos receptores do tipo $\text{A}_{2\text{A}}$ (FREDHOLM et al., 1999), podemos concluir que a melhora no desempenho físico esteja relacionado com aumento da neurotransmissão dopaminérgica promovida pelo efeito antagônico da cafeína nos receptores $\text{A}_{2\text{A}}$.

Neste contexto, deve ser ressaltado que a sinalização mediada pela adenosina, via receptores A_1 e $\text{A}_{2\text{A}}$ no SNC desempenha um papel inibitório sobre a neurotransmissão dopaminérgica, serotoninérgica e glutamatérgica (FLAGMEYER; HAAS; STEVENS, 1997; GOLEMBIOWSKA, K; ZYLEWSKA, 1997; OKADA et al., 2001; OKADA; MIZUNO; KANEKO, 1996; WOOD et al., 1989). Por outro lado, a administração intracerebroventricular da cafeína em ratos, melhorou o desempenho físico (na esteira) em 60%, enquanto a administração do agonista, adenosina-5'-etilcarboxamida (NECA) dos receptores $\text{A}_1/\text{A}_{2\text{A}}$, reduziu em 68% em relação ao veículo. No entanto, a pré-tratamento com cafeína foi eficaz em bloquear a diminuição do tempo de execução pelo

NECA. Sugerindo que a cafeína pode atrasar a fadiga através de mecanismos do SNC bloqueando o receptor de adenosina (DAVIS et al., 2003),

Assim, poderia justificar, em nosso modelo experimental que, mesmo concentrações mais baixas da cafeína no estriado levaria à uma melhora do desempenho, visto que essa estrutura seria mais sensível à dose ergogênica de cafeína na atividade em esteira. Por outro lado, o córtex pré-frontal foi o tecido cerebral que apresentou a maior concentração de cafeína e, esta distribuição, não foi afetada pelo exercício. Não existe na literatura o motivo pelo qual a cafeína possui alta afinidade por esta região, o que sabemos é que esta região possui alta densidade dos receptores A₁, os quais são alvos da cafeína (FREDHOLM et al., 1999, 2011).

Considerando essa distribuição rápida da cafeína no sangue e nos tecidos envolvidos na atividade física, quantificamos o efeito ergogênico, ao administrarmos o fármaco 15 min antes do teste de esforço máximo. Assim, neste modelo, conseguimos demonstrar resultados mais robustos ao compararmos com o grupo que recebeu a cafeína 30 min antes do teste.

Essa farmacocinética diferenciada observada nos camundongos, encoraja estudos mais detalhados no futuro com desenhos experimentais mais apropriados, uma vez que a cinética da cafeína não segue o perfil observado em humanos. Além disso, nos estimula a uma análise mais criteriosa a respeito dos estudos realizados *in vivo* e seu potencial translacional para os humanos. Demonstramos que o pico de cafeína no sangue, em camundongos, é mais curto do que em humanos (cerca de 15 min para camundongos; cerca de 30 - 60 min para humanos) (BONATI et al., 1982; KAMIMORI et al., 2002), de conformidade com a maior taxa metabólica observado em camundongos. Portanto, se a farmacocinética da cafeína humana é extrapolada diretamente para diferentes modelos animais poderão ser gerados resultados contraditórios.

Tem sido descrito que a ativação da AMPK contribui para um aumento na capacidade de exercício de camundongos (NARKAR et al., 2008). O ribonucleotídeo AICA (AICAR), um fármaco ativador da AMPK, promoveu uma melhora no desempenho físico em camundongos sem qualquer treinamento físico em comparação com camundongos não tratados. Os animais correram por um período de tempo 23% mais longo e 44% mais distante, quando comparados com os camundongos controle (NARKAR et al., 2008). Este estudo, promoveu o debate sobre o uso de ativadores de

AMPK como *doping* e instigou a WADA para incluir o AICAR, na lista de substâncias proibidas da classe “hormônio e moduladores metabólicos”. Assim, é de interesse se outros ativadores de AMPK também podem melhorar o desempenho do exercício.

No sistema experimental empregado, a cafeína não teve efeito sobre o grau de fosforilação da proteína AMPK. Por outro lado, em dois modelos diferentes, *in vitro* e *in vivo*, a cafeína promoveu um aumento, significativo, no conteúdo de AMPk e AMPK-p (EGAWA et al., 2011). A diferença dos resultados pode ser justificada em razão do modelo empregado; nossos animais foram submetidos a 30 min de corrida na esteira, numa baixa intensidade de esforço, antes da administração da cafeína.

É bem aceito que o efeito ergogênico da cafeína no desempenho físico é multifatorial. Inúmeras evidências demonstraram o acoplamento do SNC com o mecanismo de excitação-contração do músculo esquelético (TARNOPOLSKY, 2008b). Isso é relevante quando considerando as descobertas mostrando que a cafeína, também estimula neurônios dopaminérgicos de maneira direta e dependente da dose (NALL et al., 2016). Como demonstrado por estudos de microdiálise que os níveis de dopamina aumentam no cérebro dos ratos, após administração aguda de cafeína; esses mesmos animais, foram submetidos a atividade física em esteira e apresentaram uma melhora de desempenho (28%), resistência a fadiga, aumento da temperatura corporal e do consumo de O₂. Sugerindo que o efeito ergogênico da cafeína pode estar relacionado a mudanças na liberação de dopamina no cérebro (ZHENG et al., 2014). Este efeito, também foi dependente da dose de cafeína usada, e, portanto, sobre os níveis eliciados de cafeína no tecido cerebral (SOLINAS et al., 2002). No entanto, a liberação de dopamina foi contradita no estudo realizado em humanos, demonstrando que a cafeína aumenta a disponibilidade do receptor de dopamina estriatal, D2/D3, e não os níveis de dopamina em doses que são relevantes para o consumo humano (VOLKOW et al., 2015). Contudo, independentemente do mecanismo específico, há evidências crescentes apontando para o efeito da cafeína no sistema dopaminérgico, que parece ser dose dependente, podendo ser erroneamente interpretado de acordo com ao desenho experimental utilizado.

Assim, quando o sistema nervoso simpático e, portanto, o metabolismo é ativado pela atividade física muita atenção também deve ser dada ao grupo de músculos esqueléticos envolvidos. Diferentes músculos são recrutados na roda de corrida, na esteira, piscina, etc.; portanto, de acordo com os dados aqui apresentados, pode-se supor

que distribuição de cafeína irá desviar para os tecidos mais ativos. Consequentemente, é adequado realizar uma curva de distribuição da cafeína para o tipo de exercício físico selecionado, uma vez que o aumento da lipólise ou do metabolismo de ácidos graxos pode variar de acordo com níveis de cafeína atingidos e seus correspondentes efeitos ergogênicos. Em linha, já foi descrito que altos níveis de cafeína tecidual aumentam a lipólise e a produção de calor nos músculos esqueléticos pela inibição de fosfodiesterases e, também pelo aumento do conteúdo de proteínas desacopladoras (KOGURE et al., 2002; RYU et al., 2001). Neste contexto, o efeito pode ser mal compreendido se investigando em um músculo esquelético não específico.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados sugerem que o efeito ergogênico da cafeína, uma única dose, ocorre independentemente da idade. Ao utilizar a cafeína com fins ergogênicos, devemos dar atenção ao seu pico de ação. Em nosso modelo o grau de fosforilação da AMPK, no quadríceps, não foi alterado pelo tratamento com a cafeína. Sugerimos que o mecanismo de ação seja por ativação do SNC.

CAPITULO II:
***EFEITO CITOPROTETOR E ANTI-INFLAMATÓRIO DA CAFEÍNA NA
INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE LPS EM ROEDORES***

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1. Animais

Camundongos suíços adultos machos obtidos do Biotério Central da UFSC e, antes dos experimentos, foram mantidos por 10 dias para aclimatação no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas da UFSC. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas de plástico (38 x 31 x 17 cm.), sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas, numa temperatura ambiental de, aproximadamente, $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com acesso livre a água e ração para roedores (Nuvital, PR, Brasil). Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (PP00760/CEUA) da UFSC.

7.2 Procedimento e análises

Tanto a experimentação quanto as análises bioquímicas e processamento das amostras foram realizadas no Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, LABOX, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Para análise de expressão gênica, foi utilizado o espaço físico do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Taubaté, coordenado pelo professor Dr. Rodrigo Augusto da Silva, UNITAU.

7.3 Desenho experimental

De acordo com a **Figura 8** os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n= 5) da seguinte forma:

Grupo veículo: Animais que receberam uma única injeção de veículo (solução salina; 0,1 mL/10 g) e 15 min após, outra injeção de veículo;

Grupo LPS: Animais que receberam injeção de veículo e 15 min após uma injeção de LPS (0,33 mg/kg; i.p.);

Grupo cafeína: Animais que receberam uma injeção de cafeína (6 mg/kg; i.p.) e 15 min após uma injeção de veículo;

Grupo cafeína + LPS: Animais que receberam uma injeção de cafeína (6 mg/kg; i.p.) e 15 min após uma injeção de LPS (0,33 mg/kg; i.p.).

Após 24 h de aplicar os diferentes tratamentos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de decapitação, e o músculo esquelético quadríceps foi dissecado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultra freezer - 80 °C até a realização das diferentes mensurações, como apresentado na **Figura 8**.

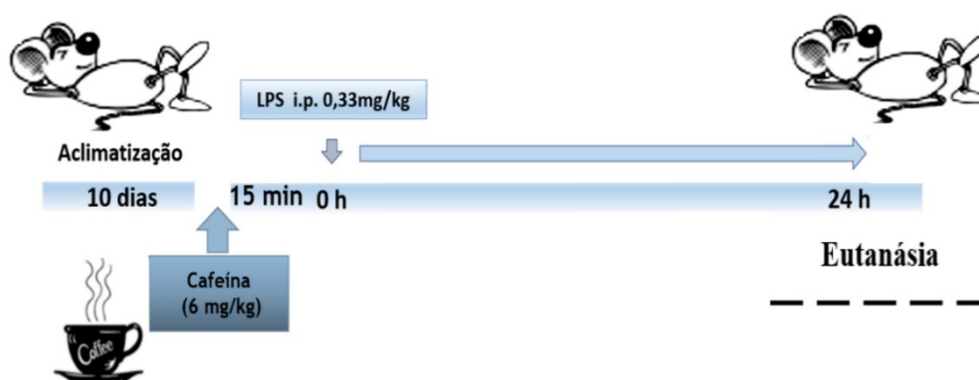


Figura 8: Representação gráfica do modelo experimental.

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, e receberam uma injeção de salina ou cafeína e 15 min após, receberam salina ou LPS; 24 h depois foram eutanasiados e o músculo quadríceps dissecado. Cada grupo experimental foi conformado por 5 animais.

7.4 Extração de ácido ribonucleico (RNA) total

O RNA total foi isolado do músculo quadríceps esquerdo utilizando o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol. Após homogeneização das amostras em 0,5 mL do reagente TRIzol® a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), seguido pela centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos novos devidamente identificados, sendo desprezada a fase. Em seguida o RNA foi precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). Após a incubação por 10 minutos a temperatura ambiente as amostras foram novamente centrifugadas (14.000 rpm por 15 minutos). Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75%. A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria após sua ressuspensão em 20 µL de água DEPC, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience) e armazenados a -80°C.

7.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da reação de transcrição reversa de 2000 ng de RNA total na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 µL contendo 500 µM de dNTP, 25 µg/mL de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 µM de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida a reação de síntese aconteceu durante 50 minutos a 50°C com posterior inativação enzimática a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído para concentração final de 100 ng/µl e armazenado a -20°C.

7.6 Quantificação da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (q-PCR)

Para o estudo do padrão de expressão gênica as reações foram realizadas com iniciadores específicos (**Tabela 3**) e tiveram como controle endógeno os genes *Gapdh* e *β -actina*. Todas as reações tiveram volume final de 10 μ L; contendo 5 μ L de SYBR Green I Master, 0,4 μ M de iniciadores específicos, 1 μ L do cDNA sintetizado e q.s.p. de água *Milli-Q Rnase free*. A quantidade relativa dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo foi subtraída pela média do Ct dos controles utilizados, resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão substituímos o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à média da expressão gênica dos genes utilizados como normalizadores. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em triplicata.

Tabela 3: Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica.

Gene (ID)	Iniciador	5'- 3' Sequência	Condições de reação	Tamanho do produto (pb)
Il 1β (16176)	Forward	GAC CTT GGA TGA GGA CA	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	183
	Reverse	AGC TCA TAT GGG TCC GAC AG		
Il 6 (16193)	Forward	AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	191
	Reverse	CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC		
Il 18 (161173)	Forward	ACT TTG GCC GAC TTC ACT GT	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	125
	Reverse	GGG TTC ACT GGC ACT TTG AT		
Tnfα (11647)	Forward	CCA CAT CTC CCT CCA GAA AA	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	259
	Reverse	AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT		
Il 10 (21926)	Forward	CCA AGC CCT TAT CGG AAA TGA	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	163
	Reverse	TTT TCA CAG GGG AGA AAT CG		
Il 13 (16163)	Forward	CAG TCC TGG CTC TTG CTT G	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	165
	Reverse	CCA GGT CCA CAC TCC ATA CC		
Adora1 (11539)	Forward	AGA ACC ACC TCC ACC CTT CT	95°C -15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	227
	Reverse	TAC TCT GGG TGG TGG TCA CA		
Adora2A (11540)	Forward	ATC CCT CAG AGA AGG GAA GC	95°C -15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	300
	Reverse	AGC TTC CCA AAG GCT TTC TC		
Prkaa1 (105787)	Forward	AGA GGG CCG CAA TAA AAG AT	95°C -15s; 59°C - 30s; 72°C - 30s	177
	Reverse	TGT TGT ACA GGC AGC TGA GG		
Ppargc1a (19017)	Forward	GCA GTC GCA ACA TGC TCA AG	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	168
	Reverse	GGG AAC CCT TGG GGT CAT TT		
Dnmt1 (13433)	Forward	CCT TTG TGG GAA CCT GGA A	95°C -15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	240
	Reverse	CTG TCG TCT GCG GTG ATT		
Dnmt3A (13435)	Forward	GAG GGA ACT GAG ACC CCA C	95°C -15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	216
	Reverse	CTG GAA GGT GAG TCT TGG CA		
Dnmt3B (13436)	Forward	AGC GGG TAT GAG GAG TGC AT	95°C -15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	91
	Reverse	GGG AGC ATC CTT CGT GTC TG		
Tet1 (52463)	Forward	GAG CCT GTT CCT CGA TGT GG	95°C -15s; 65°C - 30s; 72°C - 30s	367
	Reverse	CAA ACC CAC CTG AGG CTG TT		
Tet2 (214133)	Forward	AAC CTG GCT ACT GTC ATT GCT CCA	95°C -15s; 65°C - 30s; 72°C - 30s	211
	Reverse	ATG TTC TGC TGG TCT CTG TGG GAA		
Tet3 (194388)	Forward	GTC TCC CCA AGT CCT ACC TCC G	95°C -15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s	137
	Reverse	GTC AGT GCC CCA CGC TTC A		
β-actina (11461)	Forward	TCT TGG GTA TGG AAT CCT GTC	95°C -15s; 58°C - 30s; 72°C - 30s	82
	Reverse	AGG TCT TTA CGG ATG TCA A CG		
Gapdh (14433)	Forward	CCG CAG CGA GGA GTT TCT C	95°C -15s; 58°C - 30s; 72°C - 30s	530
	Reverse	GAG CTA AGC TCA GGC TGT TCC A		

7.7 Obtenção do DNA

Para obtenção do DNA genômico (gDNA) o músculo quadríceps esquerdo foi homogeneizado em tampão de extração (10 mM de Tris pH 3,0; 0,5 % de SDS, 5 mM de EDTA) e incubados com solução de proteínase K (20 mg/mL) por 16 h a 56 °C. Em seguida o DNA foi isolado pelo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (TREVILATTO; LINE, 2000). A quantidade e pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

7.8 Tratamento do DNA

Cada amostra de gDNA foi dividida em três tubos contendo a mesma concentração (400 ng) e incubados a 37 °C por 2 h com 1X NE buffer, 40 mM de glicose UDP e 1 unidade da enzima T4-β-glicosiltransferase (T4-BGT) em reação com volume final de 20 μL. Esta enzima transfere especificamente a porção de glicose da difosfoglicose de uridina (UDP-Glc) para 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC) pela reação de glicosilação, produzindo o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina. Este produto bloqueia especificamente a atividade de endonuclease *MspI* e faz com que ela reconheça apenas as sequências de CCGG metiladas (5-meC) e não metiladas, mantendo integras as regiões CCGG hidroximetilcitosina (5-hmeC). Após a inativação da enzima T4-BGT por incubação a 65°C por 15 min, as amostras foram digeridas com as endonucleases *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), que reconhece todas as sequencias CCGG (metiladas e não metiladas), com exceção apenas das sequências CCGG com o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina e pela *HpaII* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) que reconhece todas as sequências CCGG com a diferença de que sequências CCGG metiladas (5-meC) promove a inibição de sua atividade catalítica. No terceiro tubo foi adicionado a mesma quantidade de H₂O (gDNA não digerido – controle 100%). Todas as reações foram realizadas separadamente com volume final de 25 μL a 37°C por 2 h (Figura 9).

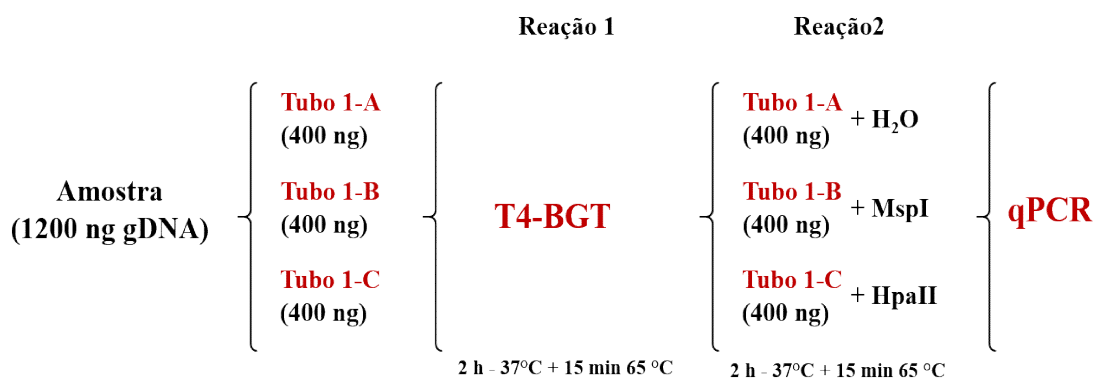


Figura 9: Esquema do tratamento do DNA.

7.9 Determinação do padrão de metilação

O padrão de metilação (5-meC) e hidroximetilação (5-hmeC) da região promotora dos genes *ADORA1* ilha 1 [F: 5' AAG GAG CTC ACC ATC CTG 3'; R: 5' GTG GGT GGG CAC AGG GTA G 3'], ilha 2 [F: 5' CGA GAC TCC ACT CTG GC 3'; R: 5' CAC CTC GGT ACT GTC CCT GT 3'], *ADORA2A* [F: 5' AGG GTG CGC CCA TGA GCG GC 3'; R: 5' CAA CCC GAG AGT CTG ACC CGC CT 3'] e *AMPK* [F: 5' CAC CTT CGG GAA AGT GAA GGG TG 3'; R: 5' GCT GGG AGC GGA GCC CGA GGC 3'] foi determinado em reações de qPCR contendo SYBR Green I Master 2x (12,5 µL) 0,4 µM de iniciadores específicos, 1,5 µL (25 ng) de gDNA tratado (nas 3 condições; H₂O, *MspI* e *HpaII*) e q.s.p de H₂O livre de nuclease. As sequências dos iniciadores foram desenhados em regiões regulatórias com ilhas CpG dentro de regiões de hipersensibilidade a DnaseI, reguladas por marcas de modificações de histonas e com sítios de ligação de fatores de transcrição utilizando o programa Primer3 Input (versão 0.4.0) (UNTERGASSER et al., 2012). A determinação de estruturas secundárias e temperaturas de anelamento foi analisada pelo programa Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/>). Todas as sequências foram blastadas para confirmação da localização cromossômica pela ferramenta de PCR *in-silico* (<https://genome.ucsc.edu/>). A obtenção dos valores percentuais referentes a metilação e hidroximetilação serão calculados a de acordo (NESTOR et al., 2012).

7.10 Análise estatística

Os resultados obtidos dos perfis transcricionais e estado de metilação da região promotora dos genes *ADORA1* e *ADORA2A* de 5 animais individuais foram analisados pelo teste de variância ANOVA, seguido pelo teste de *Tukey*, usando o programa GraphPad Prisma 6®. Em todas as medidas o α foi de 5 % bicaudal, ou seja, a significância estatística foi considerada para valores de $P \leq 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 5 experimentos independentes. Todas as reações foram realizadas em duplicata técnica. A correlação entre a expressão gênica e o padrão de metilação da região promotora foi testada utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (r), sendo considerado significativo os valores de $r \geq 0.6$.

8. RESULTADOS

8.1 O pré-condicionamento com cafeína provocou uma resposta anti-inflamatória em quadríceps de animais expostos a LPS

A **Figura 10** mostra o efeito da administração de uma única dose de cafeína (6 mg/kg; i.p.) no controle transcricional de mediadores inflamatórios 24 h após a indução de inflamação pela administração de LPS (0,33 mg/kg; i.p.). Nosso grupo de pesquisa e outros têm previamente demonstraram que 4 h após a administração de LPS as citocinas pró-inflamatórias aumentam no sangue e tecidos de roedores e iniciam o retorno a condições próximas da homeostasia a partir de aproximadamente 14 h (MARTINS et al., 2018). A **Figura 10A** aqui mostra que a expressão do gene *Il-1 β* permaneceu aumentado pelo menos durante 24 h no quadríceps dos animais tratados com LPS, e que a ativação da resposta anti-inflamatória se caracterizou pelo aumento da expressão dos genes *Il-10* ($F_{(3,16)}=19,68$; $P < 0,01$) (**Figura 10B**) e *Il-13* ($F_{(3,16)}=13,15$; $P < 0,001$) (**Figura 10C**). As **Figuras 10D** e **10E** mostram que o tratamento com cafeína provocou um aumento significativo na quantidade dos transcritos dos genes *Tnf- α* e *Il-18*, respectivamente, com uma redução significativa na expressão de do gene *Il-10* (**Figura 10B**). A figura também mostra que o pré-condicionamento com cafeína provocou uma mudança significativa na resposta inflamatória nos animais tratados com LPS, favorecendo um ambiente anti-inflamatório. Ainda, em relação ao pré-condicionamento com cafeína, as **Figuras 10A** e **10D** mostram a redução da expressão dos genes pró-inflamatórios *Il-1 β* e *Tnf- α* , respectivamente, e um aumento significativo na quantidade dos transcriptos de *Il-10* (**Figuras 10B**).

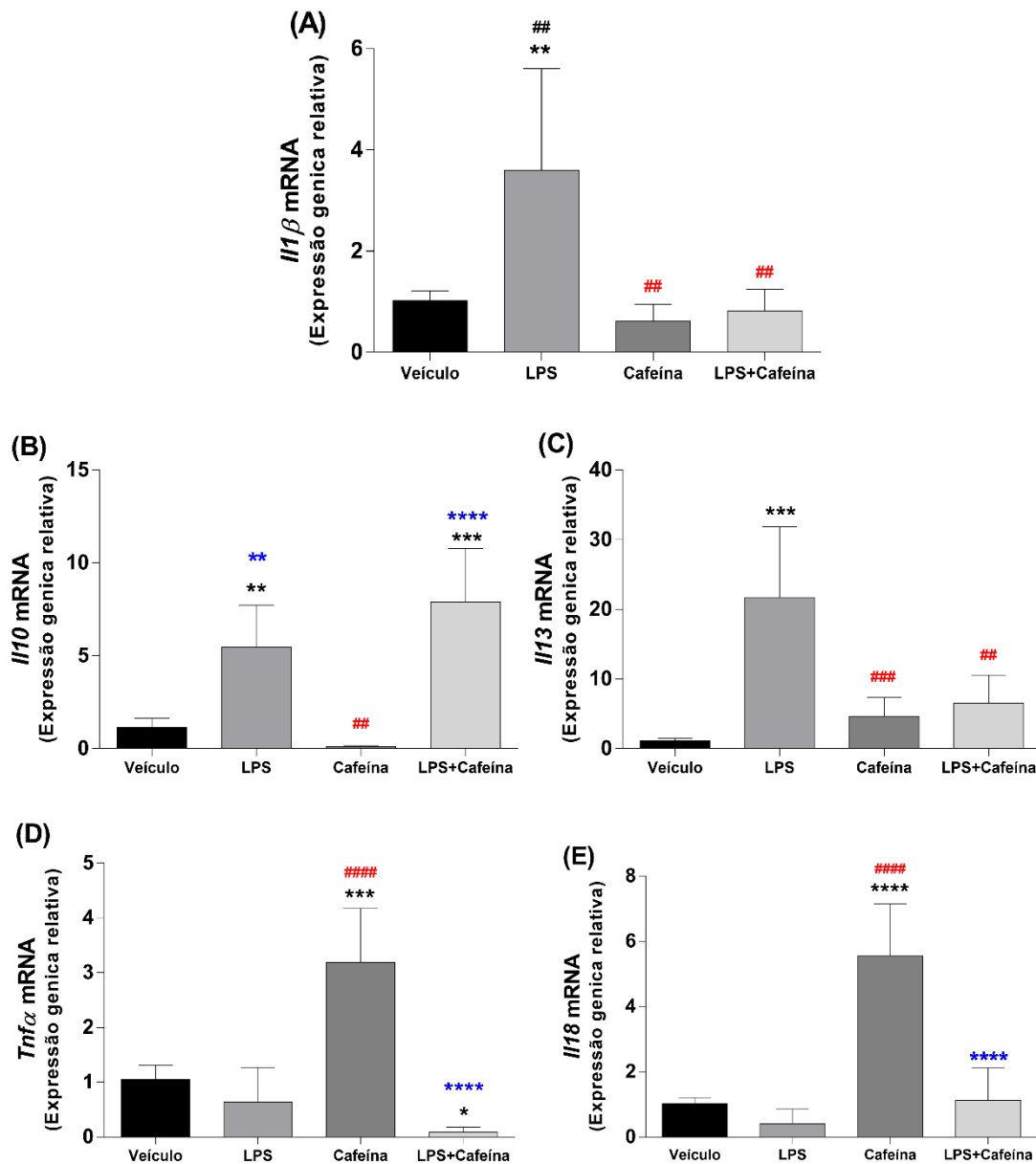


Figura 10: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de cafeína sobre a resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS) no quadríceps de roedores.

Camundongos suíços (3 meses de idade; machos; n=5) foram submetidos a uma administração de cafeína (6 mg/kg; i.p.) e/ou LPS (0,33 mg/kg; i.p.) e após 24 h tiveram os quadríceps dissecados e processados pelo método TRIzol®/clorofórmio/isopropanol para extração de RNA total como detalhado na seção de M&M. A expressão gênica foi mensurada nas preparações musculares: **(A)** Interleucina 1β (*Il-1β*); **(B)** Interleucina 10 (*Il-10*); **(C)** Interleucina 13 (*Il-13*); **(D)** fator de necrose tumoral alfa (*TNF-α*); e **(E)** Interleucina 18 (*Il-18*). A expressão dos genes *Gapdh* e *β-actina* foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta C_t}$) e representam a média + erro padrão da média de 5 experimentos independentes realizados em duplicata técnica. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ em relação ao grupo experimental veículo; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$, em relação ao grupo LPS; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$, em relação ao grupo LPS + Cafeína; ** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$ em relação ao grupo Cafeína.

8.2 O pré-condicionamento com cafeína inibe a ativação do inflamassoma em quadríceps de animais expostos a LPS

Considerando que o principal efeito anti-inflamatório da cafeína no quadríceps foi a redução a expressão gênica de *Il-1 β* (**Figura 10A**), e que esta citocina para promover os efeitos pró-inflamatórios requer do processamento pelo inflamassoma (DE ZOETE et al., 2014), a seguir foi quantificada a quantidade de transcriptos dos principais componentes que indicam a ativação do inflamassoma. A **Figura 11** mostra a modulação da expressão gênica dos genes NLRP3, ASC e caspase-1, componente dos inflamassoma NLRP3 (**Figura 11A**) em animais pré-condicionados com cafeína e submetidos a inflamação. As **Figuras 11C-D** mostram que o pré-tratamento com cafeína provocou a inibição da expressão de *ASCI* [$F_{(3,15)}=27,23$; $P < 0,0001$] e *caspase-1* [$F_{(3,15)}=53,29$; $P < 0,0001$] regulados positivamente pela exposição a LPS no quadríceps dos roedores. A **Figura 11A** mostra que expressão de *Nlrp3*, gene que codifica para o receptor do complexo inflamassoma NLRP3, foi regulado positivamente pelo pré-tratamento com cafeína (aumento de aproximadamente 40X) nos animais em estado pró-inflamatório [$F_{(3,16)}=40,16$; $P < 0,0001$]. Embora a ativação do receptor seja um evento chave na ativação do inflamassoma, a associação com os outros componentes é essencial, resultando na inibição do processamento da citocina IL-1 β como previamente mostrado na **Figura 10A**. Cabe ainda ressaltar, que a análise gráfica dos valores absolutos de expressão gênica revelou que a expressão da *caspase-1* corresponde ao gene com menor quantidade de transcriptos do inflamassoma NLRP3; portanto, uma posterior inibição da sua expressão pelo pré-condicionamento com cafeína resultará possivelmente numa inibição da ensamblagem do inflamassoma.

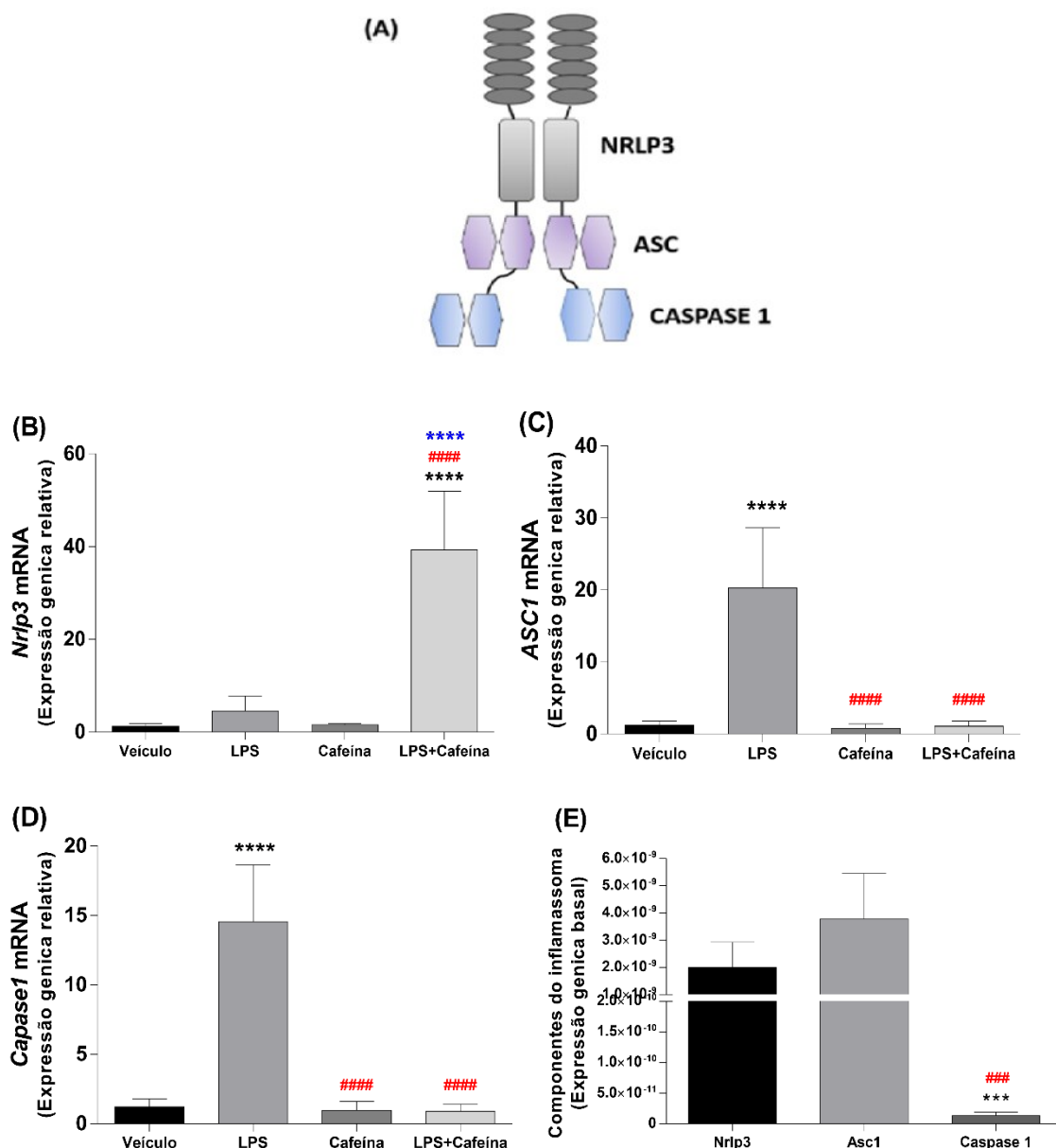


Figura 11: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de cafeína sobre a ativação do inflamassoma NLRP3 induzida por lipopolissacarídeo (LPS) no quadríceps de roedores.

Camundongos suíços (3 meses de idade; machos; n=5) foram submetidos a uma administração de cafeína (6 mg/kg; i.p.) e/ou LPS (0,33 mg/kg; i.p.) e após 24 h tiveram os quadríceps dissecados e processados pelo método TRIzol®/clorofórmio/isopropanol para extração de RNA total como detalhado na seção de M&M. A expressão gênica foi mensurada nas preparações musculares das (A) principais proteínas componentes do inflamassoma NLRP3: (B) receptor NLRP3 (*Nrip3*); (C) *ASC1*; e (D) *caspase-1*. (E) Comparação da expressão basal gênica dos componentes do inflamassoma. A expressão dos genes *Gapdh* e β -actina foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média + erro padrão da média de 5 experimentos independentes realizados em duplicata técnica. *** $P < 0,001$ em relação ao grupo experimental veículo; # $P < 0,01$; ### $P < 0,001$; #### $P < 0,0001$ em relação ao grupo LPS; **** $P < 0,0001$ em relação ao grupo Cafeína.

8.3 O pré-condicionamento com cafeína favorece a regulação positiva do gene que codifica para o receptor adenosinérgico *Adora_{2A}* no músculo quadríceps de animais submetidos a inflamação

A **Figura 12** mostra o efeito modulatório do pré-tratamento com cafeína sobre a expressão de genes relacionados com a sinalização adenosinérgica no músculo quadríceps de animais submetidos a LPS. A **Figura 12A** mostra que o nível basal de expressão gênica de *Adora₁* e *Adora_{2A}* é similar no músculo quadríceps. Contudo, as **Figuras 12B e 12C** mostram que a expressão gênica destes subtipos responde de forma distinta, tanto ao LPS como à cafeína. A **Figura 12B** mostra que o tratamento com LPS promoveu a expressão do subtipo *Adora₁* o qual foi parcialmente prevenido pelo tratamento conjunto com cafeína [$F_{(3,9)}=3,547$; $P < 0,05$]. Esta modulação da expressão gênica foi diferente para *Adora₂*. A **Figura 12C** mostra que o tratamento com cafeína modulou positivamente a expressão desse gene, aumento que foi regulado pelo estado inflamatório agudo induzido pelo LPS [$F_{(3,31)}=35,78$; $P < 0,0001$].

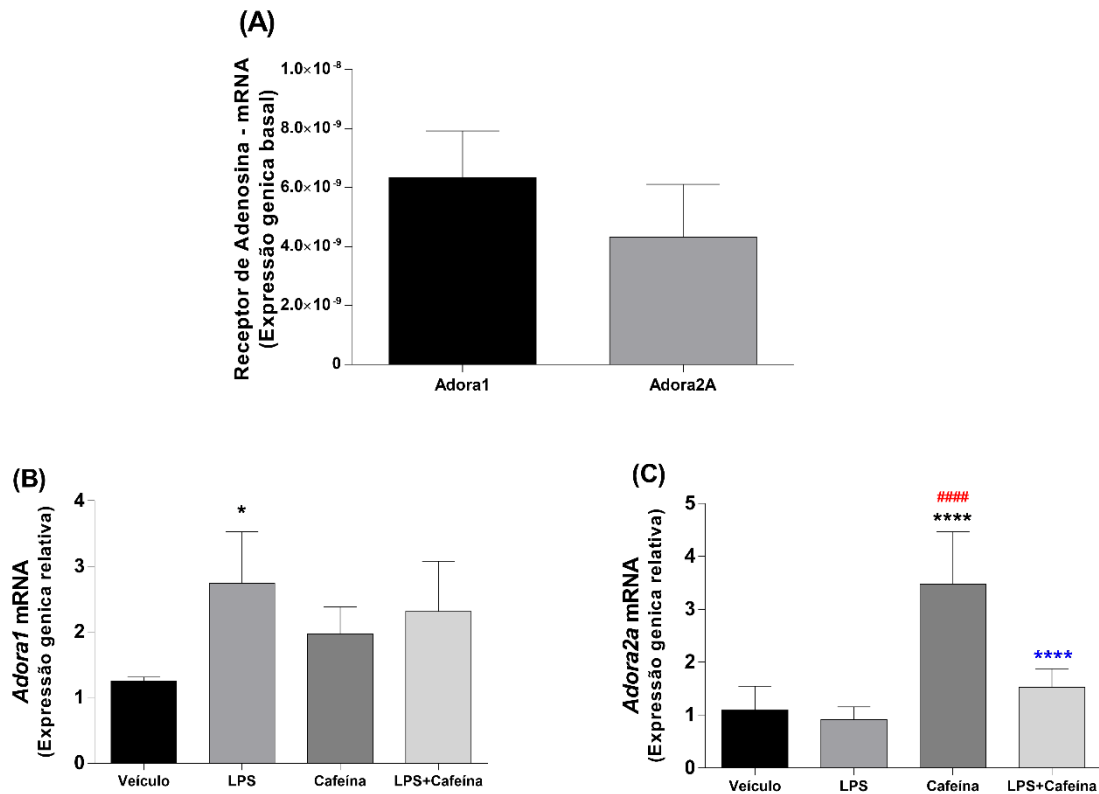


Figura 12: Efeito do pré-tratamento com cafeína na expressão de genes relacionado com a sinalização adenosinérgica no quadríceps de roedores submetidos a inflamação pela administração de lipopolissacarídeo (LPS).

Camundongos suíços (3 meses de idade; machos; n=5) foram submetidos a uma administração de cafeína (6 mg/kg; i.p.) e/ou LPS (0,33 mg/kg; i.p.) e após 24 h tiveram os quadríceps dissecados e processados pelo método TRIzol®/clorofórmio/isopropanol para extração de RNA total como detalhado na seção de M&M. A expressão gênica foi mensurada nas preparações musculares dos genes *Adora1* (A, B) e *Adora2A* (A, C). A expressão dos genes *Gapdh* e *β-actina* foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média + erro padrão da média de 5 experimentos independentes realizados em duplicata técnica. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ em relação ao grupo experimental veículo; #### $P < 0,0001$ em relação ao grupo LPS; **** $P < 0,0001$ em relação ao grupo Cafeína.

8.4 Efeito do pré tratamento da cafeína e do LPS, no controle transcricional de genes relacionados a biogênese mitocondrial e metabolismo muscular

Devido a interdependência entre PGC-1 α e AMPK no controle de programas transcricionais relacionados ao metabolismo oxidativo (CANTÓ; AUWERX, 2009) foi também avaliada a expressão desses genes no quadríceps de animais pré-condicionados com a cafeína e submetidos a inflamação. A **Figura 13A** mostra que tanto a administração do LPS como de cafeína reduziu, significativamente, a expressão gênica de *Pgc-1 α* , efeito que foi potenciado quando o tratamento foi conjunto [$F_{(3,16)}=28,44$; LPS, $P < 0,001$; cafeína e LPS + cafeína, $P < 0,0001$]. Em contrapartida, a **Figura 13B** mostra que o processo inflamatório promovido pelo LPS estimulou a expressão de *Ampk* que foi prevenido pelo pré-condicionamento com cafeína [$F_{(3,16)}=9,041$; $P < 0,01$].

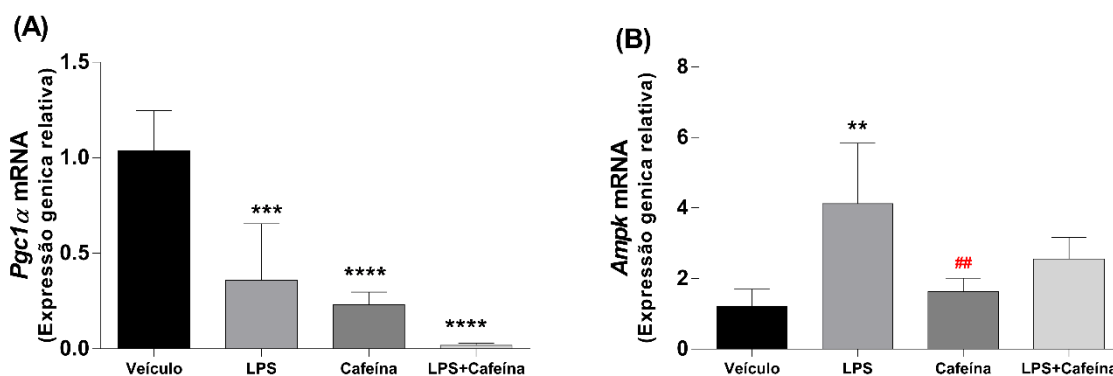


Figura 13: Efeito do pré-tratamento com cafeína na expressão de genes relacionado com o metabolismo oxidativo no quadríceps de roedores submetidos a inflamação pela administração de lipopolissacarídeo (LPS).

Camundongos suíços (3 meses de idade; machos; n=5) foram submetidos a uma administração de cafeína (6 mg/kg; i.p.) e/ou LPS (0,33 mg/kg; i.p.) e após 24 h tiveram os quadríceps dissecados e processados pelo método TRIzol®/clorofórmio/isopropanol para extração de RNA total como detalhado na seção de M&M. A expressão gênica foi mensurada nas preparações musculares dos genes relacionados com o metabolismo oxidativo (A) coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (*Pgc-1 α*) e (B) proteína cinase dependente de AMP (*Ampk*). A expressão dos genes *Gapdh* e *β -actina* foram utilizados como normalizadores. Os resultados foram calculados pelo método ($2^{-\Delta Ct}$) e representam a média + erro padrão da média de 5 experimentos independentes realizados em duplicata técnica. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$ em relação ao grupo experimental veículo; ## $P < 0,01$, em relação ao grupo LPS.

9. DISCUSSÃO

A constante busca na melhora do desempenho físico, seja por esportistas ou praticantes regulares não-atletas, tem estimulado inúmeros estudos na busca de substâncias e/ou artifícios que contribuam com a melhora do desempenho físico. Dentre as diferentes classes de suplementos, os termogênicos acabam sendo a escolha preferida por praticantes de exercícios físicos por aumentar a taxa metabólica basal, facilitando a perda de peso e gordura corporal (CAMPBELL et al., 2016). Neste sentido, os mecanismos moleculares relacionados ao efeito ergogênico da cafeína já estão, de certa forma, bem caracterizados, entretanto os mecanismos pelo qual ela exerce sua atividade protetora neuromuscular ainda são pouco explorados. Assim, neste capítulo apresentamos resultados que sugerem que o efeito protetor da cafeína para o tecido muscular esquelético seja mediando um estado anti-inflamatório. Cabe ressaltar, que muitos grupos de pesquisa têm utilizado os marcadores de inflamação, em especial as citocinas, como biomarcadores de recuperação e adaptação ao exercício (LEE et al., 2017; MACEDO, 1980).

Devido ao limitado número de estudos que abordam os mecanismos moleculares envolvidos no efeito protetor da cafeína, especificamente ao tecido muscular, projetamos um modelo em que a cafeína foi administrada 15 min antes da indução da inflamação e avaliamos seus efeitos após 24 h na tentativa de mimetizar o impacto da suplementação da cafeína na recuperação muscular. Acreditamos ser possível translacionar, mesmo que, de forma indireta o quadro inflamatório observado no músculo quadríceps com a resposta inflamatória desencadeada pelo exercício físico e, assim, utilizar os resultados obtidos pelo pré-tratamento da cafeína com seu efeito protetor, contribuindo, em parte, na elucidação dos mecanismos moleculares.

Os níveis elevados de transcritos dos genes codificantes para citocinas inflamatórias (anti e pró-inflamatórias) observado após 24 h no grupo LPS, em especial a expressão de *Il-1 β* no músculo quadríceps apoia nossa hipótese. Estes dados estão de acordo com pesquisas prévias que demonstraram maior concentração de *Il-1 β* no líquido intersticial em comparação com o plasma. Isto sugere que embora as células do músculo esquelético produzem e liberam *IL-1 β* durante a inflamação. O fato de sua liberação ser

rigidamente controlada, a qualifica como um potencial marcador biológico da ação protetora muscular (PEAKE et al., 2015).

Tendo em vista as possíveis implicações das citocinas pró-inflamatórias no metabolismo muscular, aqui demonstramos que o pré-tratamento agudo com a cafeína apresentou importante efeito protetor, visto que reduziu expressivamente a expressão da citocina pró-inflamatórias $Il-1\beta$ e aumentou a expressão gênica da citocina anti-inflamatórias, $Il-10$. Estes resultados podem ser indicativos de que a cafeína, além de melhorar o desempenho físico, também pode contribuir na recuperação do tecido muscular. O papel da síntese de citocinas endógenas no músculo propriamente dito, ainda é limitado. Contudo, já foi demonstrado que uma injeção i.p. de uma dose não letal de LPS (1.000 mg/kg), levou ao aumento dose dependente do conteúdo de mRNA do $TNF-\alpha$ e da $Il-1\beta$ no músculo gastrocnêmico após 1 h, com pico de expressão em 2 h em ratos (LANG et al., 2003). A redução da expressão gênica das citocinas pró-inflamatória $TNF-\alpha$ e $Il-1\beta$ e o aumento da expressão da $Il-10$ no grupo cafeína + LPS suporta o efeito anti-inflamatório da cafeína observado em diferentes estudos (BARCELOS et al., 2014; KOLAHDOUZAN; HAMADEH, 2017; RODAS et al., 2020). Um fato inesperado foi o aumento da expressão gênica das as citocinas pró-inflamatória $TNF-\alpha$ e $Il-18$ no grupo tratado apenas com a cafeína, mas pode representar a ativação aguda do sistema imune.

Neste caso, especificamente, nossos resultados estão em desacordo com a literatura que demonstrou, num modelo *in vitro*, que a cafeína pode inibir tanto a expressão de $TNF-\alpha$ quanto a ativação da $Il-18$, por meio do bloqueio do receptor A_1 (CHAVEZ-VALDEZ et al., 2009). Os resultados de estudos anteriores indicam que os análogos da adenosina inibem produção de espécies reativas de oxigênio, induzida por LPS por neutrófilos equinos, principalmente, por ativação de receptores A_{2A} . Assim, ao utilizar monócitos de sangue periférico, por produzirem citocinas que são responsáveis por muitos efeitos deletérios provocados por LPS, foi demonstrado que a co incubação de monócitos com um agonista do receptor A_{2A} , resultou na inibição da produção de $TNF-\alpha$, sugerindo que os análogos de adenosina inibem o efeito induzido pelo LPS (SUN et al., 2008).

Dentre os mecanismos propostos para a ação anti-inflamatória da cafeína, o mais aceito e estudado, é o bloqueio dos receptores de adenosina, devido a sua ação antagônica da molécula de adenosina (CHAVEZ-VALDEZ et al., 2009). Sendo os análogos de adenosina estáveis e seletivos para receptores A_{2A} se tornam em adequados compostos para desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias (KÖROĞLU et al., 2014). Ainda em relação aos mecanismos propostos para a ação anti-inflamatória da cafeína, um mecanismo ainda pouco explorado, mas que tem despertado a atenção de grupos de pesquisa é a formação e ativação do complexo inflamassoma NLRP3. Mesmo sabendo que tanto a IL-1 β como a IL-18 exerçam papéis centrais e crucial na iniciação e progressão de distúrbios inflamatórios no tecido muscular esquelético, e que o inflamassoma NLRP3 funciona como uma plataforma supramolecular para a maturação dependente da caspase-1 das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (BENETTI et al., 2013; GUO; CALLAWAY; TING, 2015), sua contribuição na ativação de mediadores inflamatórios no músculo quadríceps, ainda não foi investigado. Existe até o momento na literatura apenas um único relato de que a cafeína suprime a ativação do inflamassoma NLRP3 e por consequência secreção de IL-1 β e IL-18 em macrófagos THP-1 (ZHAO et al., 2019).

Nesse sentido, nosso estudo é pioneiro e mostra pela primeira vez que uma dose única de cafeína pode inibir a ativação do inflamassoma NLRP3 modulando negativamente a expressão gênica de ASC e caspase-1, dois componentes essenciais para o processamento da pró-IL1 β e pró-IL18 (BROZ; DIXIT, 2016). A caracterização do perfil transcricional dos componentes do inflamassoma NLRP3 no músculo quadríceps, revelou que dentre os genes dos membros avaliado, a caspase-1 foi o gene que apresentou a menor expressão gênica absoluta. Curiosamente, quando avaliamos somente o efeito do LPS no controle da expressão gênica dos componentes, observamos que sua ação parece ser limitada aos genes ASC e caspase-1, sendo este efeito, totalmente revertido no grupo pré-tratado pela cafeína. Por outro lado, o silenciamento do receptor A_{2A} de adenosina antagonizado pela cafeína diminuiu significativamente a expressão de caspase-1 (ZHAO et al., 2019). Este fato, nos encoraja a acreditar que a ação anti-inflamatória da cafeína se dê pela inibição competitiva dos receptores A_{2A} e inibição da expressão da caspase-1.

Na tentativa de explorar o envolvimento dos receptores de adenosina do tipo A_1 e A_{2A} , no músculo quadríceps, optamos por determinar o perfil transcricional basal. Nossos resultados mostraram que ambos receptores são expressos de forma semelhante no quadríceps. Cabe ressaltar ainda, que ambos apresentam alta afinidade com a cafeína, mas possuem funções distintas, sendo a resposta da ativação dos receptores adenosinérgicos do tipo A_{2A} antagônica aquela observada para os receptores do tipo A_1 (KESSEY; MOGUL, 1998).

10. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados sugerem que uma única dose de cafeína ao reduzir a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias controla a inflamação muscular. Podemos sugerir que o pré-tratamento agudo com cafeína, pode apresentar uma ação protetora muscular, visto que reduziu a expressão gênica das citocinas $Il-1\beta$ e $TNF-\alpha$, aumentou a expressão gênica da citocina anti-inflamatórias, $Il-10$. Essa indicação de ação protetora muscular, pode beneficiar esportistas ao reduzir o tempo de recuperação no treinamento.

11. PERSPECTIVAS DO PRESENTE TRABALHO

1. Investigar o efeito do pré-tratamento da cafeína no estado de metilação da região promotora dos genes dos receptores A_1 e A_{2A} ;
2. Investigar o efeito do pré-tratamento da cafeína no estado de metilação da região promotora dos genes da AMPK e do PGC-1 α ;
3. Investigar o efeito do pré-tratamento da cafeína + LPS em um teste incremental de esforço máximo.

ANEXO 1: Treating depression with exercise: The inflammasome inhibition perspective.

Review Article

ISSN: 2059-9781

Treating depression with exercise: The inflammasome inhibition perspective

Roberta de Paula Martins^{1,2}, Chai K Lim², Karina Ghisoni¹, Ananda Staats¹, Karine Dallagnol¹, Alexandre Solano¹, Gilles J. Guillemin², Aderbal Silva Aguiar Jr¹ and Alexandra Latini^{1*}

¹Laboratory of Bioenergetics and Oxidative Stress - LABOX, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Córrego Grande, Florianópolis, SC, Brazil

²Faculty Medicine and Health Sciences, Macquarie University, North Ryde, New South Wales, Australia

Abstract

Patients with chronic inflammation present increased blood levels of circulating cytokines and often are associated with symptoms of depression. The activation of the immune cells microglia in the brain of depressed patients has been associated with a greater prevalence of suicide, indicating a crucial role of neuroinflammation in the neuropathology of depression. In the modern lifestyle, decreased physical activity and increased sedentarism have emerged as risk factors for mental disorders, including depression. The literature is very consistent that exercise is an antidepressant; however, the molecular mechanisms responsible for these beneficial effects are far from being completely defined. We present evidence on the role of exercise in reducing neuroinflammation and inhibiting the assembly of the inflammasome in the context of depression, focusing on the potential immunomodulatory role of the biomarker neopterin.

Introduction

Depression and inflammasome activation

Depression affects up to 20% of the population worldwide, leading to a substantial social impact [1]. Major depressive disorder (MDD) is a common neurological disorder mainly characterized by depressed mood, low self-esteem and anhedonia. It is often accompanied by disrupted sleeping, eating, and impaired cognition, fatigue, aches, pain, digestive problems, reduced energy, among others [2,3]. Thus, it is considered a widespread, devastating and chronic illness, which causes profound socioeconomic burden and negative impact on the functioning and the quality of life of patients [2,4]. The physiopathology of depression is influenced by environmental and genetic factors, including social relationships and specific alterations in genes' coding, *i.e.*, neurotrophic factors, like brain-derived neurotrophic factor (BDNF) or brain signaling molecules such as 5-hydroxytryptamine (5-HT), whose deficiency compromises many neuronal functions. In addition, the physiopathology of depression has been associated with increased oxidative stress status [5], mitochondrial dysfunction [6], reduced neurogenesis [7] and chronic inflammation [8].

Inflammation is a protective and coordinated response to cellular stress that results from the elegant communication among different types of immune cells. Acute inflammation is an early and almost immediate tissue response, *i.e.*, to injury. It is non-specific, of short duration, and occurs before the immune response is established. At this stage, the main objective of the immune response is to remove the cellular stress: injury, injurious agents, foreign bodies or aka hypersensitivity reactions. On the other hand, chronic inflammation is not a part of the natural healing process, and eventually chronic inflammation will cause organ damage, including mental illness, since the body is not prepared to cope with persistent unfocused immune activity.

The inflammatory response is coordinated by cytokines, immunomodulatory molecules typically produced by immune cells [9]. The immune response can be either toxic or protective, depending on the signals the immune cells receive. The functions of the different cytokines are very complex and will also depend on the context and the concentration in relation to one another. Cytokines such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), and interleukin-1 β (IL-1 β) are considered to have profound pro-inflammatory functions. On the contrary, cytokines such as interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10) are considered to have anti-inflammatory properties [9].

Pro-inflammatory cytokines are mainly produced by immune cells, such as macrophages, neutrophils, natural killer cells, microglia and astrocytes. These cells are activated by the recognition of noxious stimuli originated from pathogens or the host it, which is mediated by molecular sensors, collectively called pattern recognition receptors. Their activation leads to signaling pathways that can culminate in the induction of transcription factors, as the kappa B nuclear factor (NF- κ B), a master pro-inflammatory transcription factor which induces the synthesis of most pro-inflammatory cytokines (e.g., TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, and IL-12).

Most cytokines due to the presence of signal peptides in its structure

Correspondence to: Alexandra Latini, Laboratory of Bioenergetics and Oxidative Stress, LABOX, Department of Biochemistry, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina - UFSC, Florianópolis - SC, 88040-900, Brazil, Tel: +55 48 37214743; Fax: +55 48 37219672; E-mail: a.latini@ufsc.br

Key words: Physical exercise, depression, Inflammasome, neopterin, neuroprotection

Received: November 21, 2016; **Accepted:** December 13, 2016; **Published:** December 17, 2016

ANEXO 2: Potential pitfalls when investigating the ergogenic effects of caffeine in mice.

Potential pitfalls when investigating the ergogenic effects of caffeine in mice

Alexandre Francisco Solano^{1*}, Débora da Luz Scheffer^{1*}, Ana Cristina de Bem Alves¹, Aderbal Silva Aguiar Jr¹, and Alexandra Latini^{1*}

¹Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo – LABOX, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Córrego Grande, Florianópolis, SC, Brazil

*Equal participation

Caffeine (1,3,7-trimethylxantine) is the most commonly consumed social drug in western society for increased physical and cognitive performance [1-5], and it is the main ergogenic resource used by athletes [6]. Initially controversial, caffeine was banned by the International Olympic Committee from 1980-2003 [1,6,7], but then in 2004 its use was approved by the World Anti-doping Agency (WADA), and later this year by the U.S. Anti-doping Agency (USADA; 2016). However, caffeine has remained on the lists of monitored substances of these anti-doping agencies.

The ergogenic effects of caffeine have been demonstrated in different sport modalities, namely running [8,9], cycling [10,11], rowing [12], track and field [3], team sports [4], and martial arts [13], among others.

Caffeine is rapidly and completely absorbed by the gastrointestinal tract and is readily distributed throughout all tissues of the body, including muscles and the central nervous system (CNS), which are believed to be the main recipients of caffeine's ergogenic effects [2,14]. Ergogenic doses of caffeine ranging from 3 to 9 mg/kg body mass [6] appear to have no adverse effects. A moderate oral dose of 6 mg/kg body mass, which elicits peak plasma levels of about 60 µmol/L concentrations after 30 to 60 min, with half-life for elimination range between 2.5-10 h, is known to enhance physical and cognitive performance [5,6,10,14,15]. Blood levels of 1 – 2 mmol/L are known to be toxic and even lethal [14], and have been associated with suicides [16]. Caffeine's molecular mechanisms for increasing physical performance are still virtually undefined. However, due to its ability to cross the blood-brain barrier at blood concentrations generated by a moderate ergogenic dose, and because of its properties as a stimulant psychotropic drug [15,17], mechanisms involving metabolic and central effects have been proposed.

Metabolic effects of caffeine have been mainly related to the enhancement of lipolysis, fatty acid oxidation and energy expenditure via the stimulation of the sympathetic nervous system [18,19] and a sequential sparing of muscle glycogen [20]. However, the main pharmacological effects of caffeine appear to be mediated via the CNS where caffeine counterbalances the inhibitory neuromodulation of adenosine in order to induce effects on both the CNS and peripheral nervous system to reduce pain and exertion perception [21], to improve motor recruitment [22] and to increase excitation-contraction coupling [23,24].

Caffeine is a non-selective competitive adenosine receptor antagonist (A₁R and A₂AR subtypes) that increases neurotransmission via dopamine D₂ receptors (D₂R) [25,26]. The striatum expresses high levels of A₂AR where they are co-expressed with postsynaptic D₂R,

forming A₂AR-D₂R heterodimers [25]. In this scenario, caffeine fails to be ergogenic in the mouse lacking A₂AR [27], or in wild type rats treated with the selective A₂AR agonist 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) [26], which denotes the participation of these receptors in caffeine's central-mediated ergogenic effects.

When designing experimental models to better define the molecular mechanisms involved in the enhanced capacity of caffeine to positively modulate physical performance, animals received the drug mostly during resting metabolic conditions. Here, we confirmed previous observations that a moderate human ergogenic dose of caffeine (6 mg / kg body mass), administered intraperitoneally (i.p.) at resting basal conditions (Figure 1A), significantly increased exercise performance in adult (three-month-old) and older (seven-month-old) mice that were challenged in a maximal exercise treadmill test (Figures 1B and 1D, respectively). Mice were tested in the treadmill after 30 min of caffeine i.p. administration, at the caffeine blood peak period defined for humans [15]. Drug-receiving mice remained on the treadmill for longer periods of time, and as a consequence reaching significantly higher running speeds (Figures 1B and 1D). In addition, higher levels of blood lactate were observed at the end of the exercise protocol, in agreement with increased exercise workloads (Figures 1C for three-month-old mice and Figure 1E for seven-month-old mice). Even when significant, the observed ergogenic effect in both groups of animals was modest compared to the overt effect seen in humans [8,9]. Therefore, we wonder whether the mice were effectively in the blood peak of caffeine and whether it differs when the sympathetic nervous system is stimulated by physical activity [28].

Mice at rest or submitted to continuous physical activity for 30 min received a single caffeine dose (6 mg/kg body mass; i.p.) and afterwards the blood and tissue concentrations of the drug were measured over time (Figure 2A). Blood caffeine pharmacokinetics showed the same profile in both groups of mice, in the resting and active animals, with peak plasma levels of 24.1 and 20.0 µmol/L after 15 min, and with a half-life for elimination of 31.6 and 33.5 min, respectively. A single Student *t* test analysis at 0 and 15 min (Figure 2B) showed statistical differences, indicating the distribution of caffeine into the tissues was faster when

Correspondence to: Alexandra Latini, Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, LABOX, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis – SC, 88040-900, Brazil, Tel: +55 48 37214743; Fax: +55 48 37219672; E-mail: a.latini@ufsc.br

Received: February 12, 2017; **Accepted:** March 02, 2017; **Published:** March 06, 2017

ANEXO 3: Epigenetic modifications induced by exercise: Drug-free intervention to improve cognitive deficits associated with Obesity

Physiology & Behavior xxx (xxxx) xxx-xxxx



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com



Review

Epigenetic modifications induced by exercise: Drug-free intervention to improve cognitive deficits associated with obesity

Leonardo Barros ^a, Tuany Eichwald ^a, Alexandre Francisco Solano ^a, Débora da Luz Scheffer ^a, Rodrigo Augusto da Silva ^b, Joana M. Gaspar ^{a,c}, Alexandra Latini ^{a,*}

^a Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (LABOX), Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

^b Departamento de Química e Bioquímica, Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus Botucatu, Botucatu, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFSC, Florianópolis, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Epigenetics
Obesity
Exercise
Cognitive impairment
BDNF
Gene expression

ABSTRACT

Obesity and metabolic disorders are increasing worldwide and are associated with brain atrophy and dysfunction, which are risk factors for late-onset dementia and Alzheimer's disease. Epidemiological studies demonstrated that changes in lifestyle, including the frequent practice of physical exercise are able to prevent and treat not only obesity/metabolic disorders, but also to improve cognitive function and dementia. Several biochemical pathways and epigenetic mechanisms have been proposed to understand the beneficial effects of physical exercise on cognition. This manuscript revised central ongoing research on epigenetic mechanisms induced by exercise and the beneficial effects on obesity-associated cognitive decline, highlighting potential mechanistic mediators.

1. Introduction

Obesity is a complex condition that has reached epidemic proportions worldwide and has become a major contributor to the global burden of chronic diseases and disabilities. Obesity coexists with under-nutrition in developing countries, with serious social and psychological dimensions, affecting virtually all ages and socioeconomic groups. According to the World Health Organization (WHO), 1.9 billion adults were overweight and at least 650 million were clinically obese in 2016 [1].

Obesity is a risk factor for several metabolic diseases, such as insulin resistance and type 2 diabetes, whose prevalence is also increasing globally. A growing body of evidence has demonstrated that obesity, insulin resistance, and diabetes are associated with impairment of hippocampal-dependent cognition and memory, presenting a higher risk for the development of dementia [2,3]. In addition, obesity and higher body mass index (BMI) over the course of a lifetime are associated with lower cognitive performance, cognitive decline, reduced white matter, decreased blood brain barrier integrity, brain atrophy and increased risk for late onset Alzheimer's disease (AD) [4].

Changes in lifestyle, including reduced caloric intake and increased physical activity, are recommended for prevention and treatment of obesity and associated metabolic disorders [5]. According to the Physical Activity Guidelines for Americans [6], adults with chronic health conditions such as cancer, osteoarthritis, hypertension, multiple sclerosis, type 2 diabetes, dementia and other cognitive disorders should practice 150 to 300 minutes a week of moderate-intensity aerobic activity, or 75 to 150 minutes a week of vigorous-intensity aerobic activity. With additional health benefits, these individuals should associate aerobic activity with moderate/higher intensity muscle-strengthening activities, that involve all major muscle groups. Lifestyle interventions can benefit not only loss of body mass and improve metabolic health or cardiovascular risk [7], but they can also improve cognitive function in children, adolescents and adults [8–10].

During the last decade, several biochemical pathways have been investigated to understand the underlying mechanisms involved in the beneficial effects of physical exercise on cognition, obesity and many other conditions with chronic progression. While performance, muscle size and insulin sensitivity may decline after a few weeks of physical inactivity [11], some other exercise-induced effects last for considerable time, to the point of affecting future generations as recently shown

* Corresponding author at: Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (LABOX), Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Campus Universitário – Córrego Grande, Bloco C-201/214, Florianópolis 88040-900, Brazil.

Email address: a.latini@ufsc.br (A. Latini)

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.03.009>

Received 31 December 2018; Received in revised form 11 March 2019; Accepted 11 March 2019

Available online xxx
0031-9384/© 2018.

ANEXO 4: Role of Adenosine A_{2A} Receptors in the Central Fatigue of Neurodegenerative Diseases.

JOURNAL OF CAFFEINE AND ADENOSINE RESEARCH
Volume 00, Number 00, 2019
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/caff.2019.0009

Role of Adenosine A_{2A} Receptors in the Central Fatigue of Neurodegenerative Diseases

Ana Cristina de Bem Alves, MSc,¹ Viviane José de Oliveira Bristot, BSc,¹ Mirieli Denardi Limana, MSc,¹
Ana Elisa Speck, PhD,¹ Leonardo Soares de Barros, BSc,²
Alexandre Francisco Solano, MSc,² and Aderbal S. Aguiar, Jr., PhD¹

Fatigue reflects a typical limitation of endurance to physical exertion, but it is also a symptom at rest in many neurodegenerative diseases, which impair common activities in patients with multiple sclerosis, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease. In this case, the symptom is known as central fatigue. The pharmacological and environmental approach of central fatigue is not effective because the pathophysiology is unclear. Raised neuronal adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R) density is associated with the pathology and clinical condition of these neurodegenerative diseases. The nonselective adenosine receptor antagonist caffeine has been shown to be a good therapeutic option for these cases. Caffeine is also the main ergogenic resource used by athletes. In this mini-review, we propose that central fatigue can be mediated by A_{2A}R in the central nervous system and that caffeine may be a good therapeutic option for central fatigue or neurodegenerative patients.

Keywords: adenosine, Alzheimer's disease, caffeine, fatigue, multiple sclerosis, Parkinson's disease

Introduction

FATIGUE IS A NEUROBIOLOGICAL response to sustained muscle contraction and physical effort.¹ It is also a common rest symptom of neurological diseases.² Exercise-induced fatigue reduces with rest and does not affect daily activities,¹ whereas fatigue symptom negatively impacts daily activities and patients' quality of life.³ In this case, the symptom is known as central fatigue. Patients with multiple sclerosis (MS), Parkinson's disease (PD), and Alzheimer's disease (AD) report central fatigue as a symptom associated with poorer quality of life and disability.⁴

Fatigability is a concept used to describe objective impairments in physical performance, such as decreased muscle strength or running speed, different from the subjective characteristics of fatigue.² Repeated maximal sprint running decreases quadriceps strength, which can be assessed by knee extensor maximal voluntary contraction as a measure of fatigability.⁵ Cerebral palsy patients present a great decrease in muscle strength.⁶ However, the athlete or pa-

tient feels the fatigue, something difficult to measure with the current research instruments. Central fatigue is an overwhelming sense of tiredness even at rest, lack of endurance, and loss of mental and physical energy to perform daily activities, including exercises.⁷ Annual fatigue symptom costs approach US\$ 126 billion in the United States.³ Moreover, fatigue is considered a chronic condition when it lasts more than 6 months, because of the underlying disease activity (e.g., advanced cancer and MS) or mental disorders (e.g., depression and anxiety disorders).⁸

The mechanisms of central fatigue in neurodegenerative diseases are still unknown, but the available treatments are based on palliative care.¹ Immunomodulatory and cholinergic medications, such as nortriptyline, clonazepam, 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine, modafinil, amantadine, pemoline, and methylprednisolone, have been used for MS patients to reduce the enhanced perception of fatigue.^{9–18} Levodopa (L-DOPA), the precursor of dopamine (DA), has shown beneficial effects of fatigue in PD,^{19,20} such as improvement in physical fatigue in finger tapping and force generation.^{19,20}

¹Exercise Biology Lab, Department of Health Sciences, UFSC—Universidade Federal de Santa Catarina, Araranguá, Brazil.

²LABOX—Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, UFSC—Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

ANEXO 5: Physical Exercise Potentials Against Viral Diseases Like COVID-19 in the Elderly.



Physical Exercise Potentials Against Viral Diseases Like COVID-19 in the Elderly

Sandra Amatriain-Fernández^{1,2*}, Thomas Gronwald³, Eric Murillo-Rodríguez⁴, Claudio Imperatori⁵, Alexandre Francisco Solano⁶, Alexandra Latini^{6†} and Henning Budde^{2†}

¹ Faculty of Sport Sciences and Physical Education, University of A Coruña, A Coruña, Spain, ² Department of Pedagogy, Faculty of Human Sciences, Medical School Hamburg, Hamburg, Germany, ³ Department of Performance, Neuroscience, Therapy and Health, Faculty of Health Sciences, Medical School Hamburg, Hamburg, Germany, ⁴ School of Medicine, Anahuac Mayab University, Mérida, Mexico, ⁵ Cognitive and Clinical Psychology Laboratory, Department of Human Science, European University of Rome, Rome, Italy, ⁶ Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo - LABOX, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Keywords: physical exercise, physical activity, viral diseases, coronavirus, COVID-19, immune response, high-risk groups, elderly

OPEN ACCESS

Edited by:

Graziemaria Corbi,
University of Molise, Italy

Reviewed by:

Carlo Pietro Campobasso,
University of Campania Luigi
Vanvitelli, Italy
Valeria Conti,
University of Salerno, Italy

*Correspondence:

Sandra Amatriain-Fernández
sandra.amatriain@udc.es

[†]These authors share
senior authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Geriatric Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 07 May 2020

Accepted: 18 June 2020

Published: 03 July 2020

Citation:

Amatriain-Fernández S, Gronwald T,
Murillo-Rodríguez E, Imperatori C,
Solano AF, Latini A and Budde H
(2020) Physical Exercise Potentials
Against Viral Diseases Like COVID-19
in the Elderly. *Front. Med.* 7:379.
doi: 10.3389/fmed.2020.00379

INTRODUCTION

In the last few months, we have been living through an epic public health threat around the globe due to the spread of a novel coronavirus (SARS-CoV-2) that causes coronavirus disease 2019 or COVID-19 (1). COVID-19 is clinically characterized by fever, cough, fatigue, incapacity to breathe, pneumonia/other respiratory tract symptoms, kidney failure, neurological symptoms and even death (1–7). Recent publications have shown that COVID-19 impairs immune system response by severely compromising the number and function of T cells, especially Natural Killer (NK) cells, and by increasing the levels of blood C-reactive protein (CRP) and pro-inflammatory cytokines and causing atrophy of spleen and lymph nodes, along with reduced lymphocytes in lymphoid organs (2–7). This immune dysregulation had a fatal outcome mainly in individuals with pre-existing medical conditions and elderly patients (2, 4, 7).

According to the United Nations, there were 703 million people aged 65 years or older worldwide in 2019, which implies that about 10% of our world population is at higher risk for negative prognosis under COVID-19 infection. Aging is characterized by several changes, including exacerbated inflammatory responses mediated by the innate immune system with reduced capacity to protect against infections, cancer and wound healing, leading to more severe consequences of bacterial and viral infections and reduced response to vaccination (8). This pro-inflammatory status renders older individuals susceptible to tissue-damaging immunity and chronic inflammatory diseases. Therefore, interventions that can prevent or retard the decline of immunocompetence would have a considerable clinical and public health impact on this parcel of the population. In this scenario, the regular practice of physical activity and physical exercise has been widely prescribed, including for elderly people, since it favors anti-inflammatory status, promoting healthier aging and reducing all-cause mortality (9).

CHRONIC AND ACUTE PHYSICAL EXERCISE INTERVENTIONS AND THEIR EFFECTS ON THE IMMUNE SYSTEM

Physical activity is defined as any bodily movement produced by the contraction of skeletal muscles, including sports, leisure activities, dancing, walking, and physical exercise (10). Physical exercise,

REFERÊNCIAS

ACHESON, Kevin J. et al. Metabolic effects of caffeine in humans: Lipid oxidation or futile cycling? **American Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 40–46, 2004. DOI: 10.1093/ajcn/79.1.40.

AGUIAR, Aderbal S.; SPECK, Ana Elisa; CANAS, Paula M.; CUNHA, Rodrigo A. Neuronal adenosine A2A receptors signal ergogenic effects of caffeine. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-69660-1.

AHRENDT, Dale M. **Ergogenic Aids: Counseling the Athlete** **American Family Physician**. [s.l.: s.n.].

ANDRIS, Fabienne; LEO, Oberdan. AMPK in lymphocyte metabolism and function. **International reviews of immunology**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 67–81, 2015. DOI: 10.3109/08830185.2014.969422.

APPLEGATE, Elizabeth. Effective nutritional ergogenic aids. *In*: INTERNATIONAL JOURNAL OF SPORT NUTRITION 1999, **Anais [...]**. : Human Kinetics Publishers Inc., 1999. p. 229–239. DOI: 10.1123/ijsn.9.2.229.

ARAUJO, Rodrigo De; POLI, Bonetti De; MIYAGI, Willian Eiji; NAKAMURA, Fabio Yuzo. Caffeine Improved Time to Exhaustion , But Did Not Change Alternative Maximal Caffeine Improved Time to Exhaustion But Did Not Change Alternative Maximal Accumulated Oxygen Deficit Estimated During a Single Supramaximal Running Bout. [S. l.], n. October, 2017. DOI: 10.1123/ijsnem.2016-0038.

ASTORINO, Todd A.; ROBERSON, Daniel W. Efficacy of acute caffeine ingestion for short-term high-intensity exercise performance: a systematic review. **Journal of strength and conditioning research**, United States, v. 24, n. 1, p. 257–265, 2010. DOI: 10.1519/JSC.0b013e3181c1f88a.

AXELSSON, J.; THESLEFF, S. Activation of the Contractile Mechanism in Striated Muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 55–66, 1958. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1958.tb01608.x.

BARCELOS, Rômulo Pillon; SOUZA, Mauren Assis; AMARAL, Guilherme Pires; STEFANELLO, Silvio Terra; BRESCIANI, Guilherme; FIGHERA, Michele Rechia; SOARES, Félix Alexandre Antunes; DE VARGAS BARBOSA, Nilda. Caffeine intake

may modulate inflammation markers in trained rats. **Nutrients**, [*S. l.*], v. 6, n. 4, p. 1678–1690, 2014. DOI: 10.3390/nu6041678.

BAZZUCCHI, Ilenia; FELICI, Francesco; MONTINI, Marco; FIGURA, Francesco; SACCHETTI, Massimo. Caffeine improves neuromuscular function during maximal dynamic exercise. **Muscle & nerve**, [*S. l.*], v. 43, n. 6, p. 839–44, 2011. DOI: 10.1002/mus.21995.

BENETTI, Elisa; CHIAZZA, Fausto; PATEL, Nimesh S. A.; COLLINO, Massimo. The NLRP3 Inflammasome as a novel player of the intercellular crosstalk in metabolic disorders. **Mediators of inflammation**, [*S. l.*], v. 2013, p. 678627, 2013. DOI: 10.1155/2013/678627.

BENOWITZ, N. L. Clinical Pharmacology of Caffeine. **Annual Review of Medicine**, [*S. l.*], v. 41, n. 1, p. 277–288, 1990. DOI: 10.1146/annurev.me.41.020190.001425.

BERGMANN, Michael; GORNIKIEWICZ, Alexander; SAUTNER, Thomas; WALDMANN, Elke; WEBER, Thomas; MITTLBÖCK, Martina; ROTH, Erich; FÜGGER, Reinhold. Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. **Shock**, [*S. l.*], v. 12, n. 6, p. 421–427, 1999. DOI: 10.1097/00024382-199912000-00002.

BESSA, Artur L.; OLIVEIRA, Vanessa N.; AGOSTINI, Guilherme G.; OLIVEIRA, Renato J. S.; OLIVEIRA, Ana C. S.; WHITE, Gillian E.; WELLS, Greg D.; TEIXEIRA, David N. S.; ESPINDOLA, Foued S. EXERCISE intensity and recovery: Biomarkers of injury, inflammation, and oxidative stress. **Journal of Strength and Conditioning Research**, [*S. l.*], v. 30, n. 2, p. 311–319, 2016. DOI: 10.1519/JSC.0b013e31828f1ee9.

BLAGIH, Julianna et al. The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. **Immunity**, [*S. l.*], v. 42, n. 1, p. 41–54, 2015. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.12.030.

BONATI, M.; LATINI, R.; GALLETI, F.; YOUNG, J. F.; TOGNONI, G.; GARATTINI, S. Caffeine disposition after oral doses. **Clinical pharmacology and therapeutics**, [*S. l.*], v. 32, n. 1, p. 98–106, 1982. DOI: 10.1038/clpt.1982.132.

BOREA, Pier Andrea; GESSI, Stefania; MERIGHI, Stefania; VINCENZI, Fabrizio; VARANI, Katia. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. **Physiological reviews**, United States, v. 98, n. 3, p. 1591–1625, 2018. DOI: 10.1152/physrev.00049.2017.

- BROZ, Petr; DIXIT, Vishva M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature reviews. Immunology**, England, v. 16, n. 7, p. 407–420, 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.58.
- BRUNDEGE, James M.; DUNWIDDIE, Thomas V. Role of Adenosine as a Modulator of Synaptic Activity in the Central Nervous System. **Advances in Pharmacology**, [S. l.], v. 39, n. C, p. 353–391, 1997. DOI: 10.1016/S1054-3589(08)60076-9.
- BURKE, Louise M. SYMPOSIUM / SYMPOSIUM Caffeine and sports performance. [S. l.], n. January 2009, 2014. DOI: 10.1139/H08-130.
- BUTCHER, R. W.; BAIRD, C. E.; SUTHERLAND, E. W. Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3',5'-monophosphate levels in isolated fat cells. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 243, n. 8, p. 1705–1712, 1968. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)93503-9.
- CALVO, Jennifer A.; DANIELS, Thomas G.; WANG, Xiaomei; PAUL, Angelika; LIN, Jiandie; SPIEGELMAN, Bruce M.; STEVENSON, Susan C.; RANGWALA, Shamina M. Muscle-specific expression of PPAR γ coactivator-1 α improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. **Journal of Applied Physiology**, [S. l.], v. 104, n. 5, p. 1304–1312, 2008. DOI: 10.1152/jappphysiol.01231.2007.
- CAMPBELL, Bill I. et al. The effects of a fat loss supplement on resting metabolic rate and hemodynamic variables in resistance trained males: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, [S. l.], v. 13, p. 14, 2016. DOI: 10.1186/s12970-016-0125-z.
- CANALS, Meritxell et al. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 278, n. 47, p. 46741–46749, 2003. DOI: 10.1074/jbc.M306451200.
- CANTÓ, Carles; AUWERX, Johan. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. **Current opinion in lipidology**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 98–105, 2009. DOI: 10.1097/MOL.0b013e328328d0a4.
- CAPPELLETTI, Simone; PIACENTINO, Daria; FINESCHI, Vittorio; FRATI, Paola; CIPOLLONI, Luigi; AROMATARIO, Mariarosaria. Caffeine-related deaths: Manner of deaths and categories at risk. **Nutrients**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 1–13, 2018. DOI: 10.3390/nu10050611.

- CARR, A.; DAWSON, B.; SCHNEIKER, K.; GOODMAN, C.; LAY, B. Effect of caffeine supplementation on repeated sprint running performance. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, [*S. l.*], v. 48, n. 4, p. 472–478, 2008.
- CARRILLO, J. A.; BENITEZ, J. **Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications***Clinical Pharmacokinetics*Adis International Ltd, , 2000. DOI: 10.2165/00003088-200039020-00004.
- CECHELLA, José L. et al. Moderate swimming exercise and caffeine supplementation reduce the levels of inflammatory cytokines without causing oxidative stress in tissues of middle-Aged rats. **Amino Acids**, [*S. l.*], v. 46, n. 5, p. 1187–1195, 2014. DOI: 10.1007/s00726-014-1679-1.
- CHALLISS, R. A.; RICHARDS, S. J.; BUDOHOSKI, L. Characterization of the adenosine receptor modulating insulin action in rat skeletal muscle. **European journal of pharmacology**, Netherlands, v. 226, n. 2, p. 121–128, 1992. DOI: 10.1016/0922-4106(92)90172-r.
- CHAVEZ-VALDEZ, Raul; WILLS-KARP, Marsha; AHLAWAT, Rajni; CRISTOFALO, Elizabeth A.; NATHAN, Amy; GAUDA, Estelle B. Caffeine modulates TNF-alpha production by cord blood monocytes: the role of adenosine receptors. **Pediatric research**, United States, v. 65, n. 2, p. 203–208, 2009. DOI: 10.1203/PDR.0b013e31818d66b1.
- CHEN, Jiang Fan; ELTZSCHIG, Holger K.; FREDHOLM, Bertil B. Adenosine receptors as drug targets-what are the challenges? **Nature Reviews Drug Discovery**, [*S. l.*], v. 12, n. 4, p. 265–286, 2013. DOI: 10.1038/nrd3955.
- CHRISTENSEN, N. J.; GALBO, H. **Sympathetic nervous activity during exercise**.**Annual review of physiology***Annu Rev Physiol*, , 1983. DOI: 10.1146/annurev.ph.45.030183.001035.
- COLE, Kevin J.; COSTILL, David L.; STARLING, Raymond D.; GOODPASTER, Bret H.; TRAPPE, Scott W.; FINK, William J. Effect of caffeine ingestion on perception of effort and subsequent work production. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, [*S. l.*], v. 6, n. 1, p. 14–23, 1996. DOI: 10.1123/ijasn.6.1.14.
- CONNELL, Charlotte J. W.; THOMPSON, Benjamin; KUHN, Gustav; CLAFFEY, Michael P.; DUNCAN, Shelley; GANT, Nicholas. Fatigue related impairments in oculomotor control are prevented by caffeine. **Nature Publishing Group**, [*S. l.*], n.

November 2015, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1038/srep26614.

CONWAY, D.; SAKAI, T. CAFFEINE CONTRACTURE. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [*S. l.*], v. 46, n. 6, p. 897–903, 1960. DOI: 10.1073/pnas.46.6.897.

CORREIA-DE-SÁ, P.; TIMÓTEO, M. A.; RIBEIRO, J. A. A(2A) adenosine receptor facilitation of neuromuscular transmission: influence of stimulus paradigm on calcium mobilization. **Journal of neurochemistry**, England, v. 74, n. 6, p. 2462–2469, 2000. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0742462.x.

CRUZ, Rogério Santos de Oliveira; DE AGUIAR, Rafael Alves; TURNES, Tiago; GUGLIELMO, Luiz Guilherme Antonacci; BENEKE, Ralph; CAPUTO, Fabrizio. Caffeine affects time to exhaustion and substrate oxidation during cycling at maximal lactate steady state. **Nutrients**, [*S. l.*], 2015. DOI: 10.3390/nu7075219.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: Different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, [*S. l.*], v. 38, n. 2, p. 107–125, 2001. DOI: 10.1016/S0197-0186(00)00034-6.

DAVIS, J. Mark; MURPHY, E. Angela; CARMICHAEL, Martin D.; DAVIS, Ben; JM, Davis; EA, Murphy; QUERCETIN, Davis B. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. [*S. l.*], v. 29208, p. 1071–1077, 2009. DOI: 10.1152/ajpregu.90925.2008.

DAVIS, J. Mark; ZHAO, Zuowei; STOCK, Howard S.; MEHL, Kristen A.; BUGGY, James; HAND, Gregory A. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [*S. l.*], v. 284, n. 2 53-2, 2003. DOI: 10.1152/ajpregu.00386.2002.

DE ARAUJO BONETTI DE POLI, Rodrigo; MIYAGI, Willian Eiji; NAKAMURA, Fabio Yuzo; ZAGATTO, Alessandro Moura. Caffeine improved time to exhaustion but did not change alternative maximal accumulated oxygen deficit estimated during a single supramaximal running bout. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, [*S. l.*], v. 26, n. 6, p. 549–557, 2016. DOI: 10.1123/ijsnem.2016-0038.

DE ZOETE, Marcel R.; PALM, Noah W.; ZHU, Shu; FLAVE, Richard A. Inflammasomes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [*S. l.*], v. 6, n. 12, 2014. DOI: 10.1101/cshperspect.a016287.

DERAVE, W.; HESPEL, P. Role of adenosine in regulating glucose uptake during

contractions and hypoxia in rat skeletal muscle. **The Journal of physiology**, [S. l.], v. 515 (Pt 1, n. Pt 1, p. 255–263, 1999. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.255ad.x.

DIXON, Alistair K.; GUBITZ, Amelie K.; SIRINATHSINGHJI, Dalip J. S.; RICHARDSON, Peter J.; FREEMAN, Tom C. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 118, n. 6, p. 1461–1468, 1996. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15561.x.

EGAN, Brendan et al. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, [S. l.], v. 588, n. Pt 10, p. 1779–90, 2010. DOI: 10.1113/jphysiol.2010.188011.

EGAWA, T.; HAMADA, T.; MA, X.; KARAIKE, K.; KAMEDA, N.; MASUDA, S.; IWANAKA, N.; HAYASHI, T. **Caffeine activates preferentially α 1-isoform of 5'AMP-activated protein kinase in rat skeletal muscle** *Acta Physiologica*, 2011. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2010.02169.x.

EGAWA, Tatsuro; HAMADA, Taku; KAMEDA, Naoko; KARAIKE, Kouhei; MA, Xiao; MASUDA, Shinya; IWANAKA, Nobumasa; HAYASHI, Tatsuya. Caffeine acutely activates 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase and increases insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscles. **Metabolism: clinical and experimental**, [S. l.], v. 58, n. 11, p. 1609–17, 2009. DOI: 10.1016/j.metabol.2009.05.013.

EL YACOUBI, Malika; LEDENT, Catherine; MÉNARD, Jean François; PARMENTIER, Marc; COSTENTIN, Jean; VAUGEOIS, Jean Marie. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 129, n. 7, p. 1465–1473, 2000. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703170.

ELMENDORST, David; MEYER, Philipp T.; MATUSCH, Andreas; WINZ, Oliver H.; BAUER, Andreas. Caffeine occupancy of human cerebral A1 adenosine receptors: in vivo quantification with 18F-CPFPX and PET. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, [S. l.], v. 53, n. 11, p. 1723–9, 2012. DOI: 10.2967/jnumed.112.105114.

FERREIRA, G. A.; FELIPPE, L. C.; BERTUZZI, R.; BISHOP, D. J.; RAMOS, I. S.; DE-

OLIVEIRA, F. R.; LIMA-SILVA, A. E. Does caffeine ingestion before a short-term sprint interval training promote body fat loss? **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, [S. l.], v. 52, n. 12, p. e9169, 2019. DOI: 10.1590/1414-431X20199169.

FISCHER, Christian P. **Interleukin-6 in acute exercise and training: What is the biological relevance?** *Exercise Immunology Review* Exerc Immunol Rev, , 2006.

FLAGMEYER, Iris; HAAS, Helmut L.; STEVENS, David R. Adenosine A1 receptor-mediated depression of corticostriatal and thalamostriatal glutamatergic synaptic potentials in vitro. **Brain Research**, [S. l.], v. 778, n. 1, p. 178–185, 1997. DOI: 10.1016/S0006-8993(97)01060-3.

FOLEY, T. E.; FLESHNER, M. Neuroplasticity of dopamine circuits after exercise: implications for central fatigue. **Neuromolecular Med**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 67–80, 2008. DOI: 10.1007/s12017-008-8032-3.

FRANCISCO SOLANO, Alexandre; DA LUZ SCHEFFER, Débora; DE BEM ALVES, Ana Cristina; SILVA AGUIAR JR, Aderbal; LATINI, Alexandra. Potential pitfalls when investigating the ergogenic effects of caffeine in mice. **Journal of Systems and Integrative Neuroscience**, [S. l.], v. 3, n. 2, 2017. DOI: 10.15761/jsin.1000156.

FREDHOLM, B. B. Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine? **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 129–132, 1980. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(79\)90046-4](https://doi.org/10.1016/0165-6147(79)90046-4).

FREDHOLM, Bertil B.; BÄTTIG, Karl; HOLMÉN, Janet; NEHLIG, Astrid; ZVARTAU, Edwin E. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. **Pharmacol Rev**, [S. l.], v. 51, n. 1, 1999.

FREDHOLM, Bertil B.; CHEN, Jiang Fan; CUNHA, Rodrigo A.; SVENNINGSSON, Per; VAUGEOIS, Jean Marie. Adenosine and Brain Function. **International Review of Neurobiology**, [S. l.], v. 63, n. February, p. 191–270, 2005. DOI: 10.1016/S0074-7742(05)63007-3.

FREDHOLM, Bertil B.; IJZERMAN, Adriaan P.; JACOBSON, Kenneth A.; LINDEN, Joel; MÜLLER, Christa E. International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - An update. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 63, n. 1, p. 1–34, 2011. DOI: 10.1124/pr.110.003285.

FREISSMUTH, M.; SELZER, E.; SCHUTZ, W. Interactions of purified bovine brain A1-adenosine receptors with G-proteins. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding. **Biochemical Journal**, [*S. l.*], v. 275, n. 3, p. 651–656, 1991. DOI: 10.1042/bj2750651.

FUXE, K. et al. Receptor heteromerization in adenosine A2A receptor signaling: relevance for striatal function and Parkinson's disease. **Neurology**, United States, v. 61, n. 11 Suppl 6, p. S19-23, 2003. DOI: 10.1212/01.wnl.0000095206.44418.5c.

GANIO, Matthew S.; KLAU, Jennifer F.; CASA, Douglas J.; ARMSTRONG, Lawrence E.; MARESH, Carl M. Effect of caffeine on sport-specific endurance performance: a systematic review. **Journal of strength and conditioning research**, United States, v. 23, n. 1, p. 315–324, 2009. DOI: 10.1519/JSC.0b013e31818b979a.

GESSI, Stefania et al. Expression, pharmacological profile, and functional coupling of A2b receptors in a recombinant system and in peripheral blood cells using a novel selective antagonist radioligand, [3H]MRE 2029-F20. **Molecular Pharmacology**, [*S. l.*], v. 67, n. 6, p. 2137–2147, 2005. DOI: 10.1124/mol.104.009225.

GILBERT, R. M. **The methylxanthine beverages and foods: chemistry, consumption, and health effects - PubMed**. [s.l: s.n.].

GLEESON, Michael; BISHOP, Nicolette C.; STENSEL, David J.; LINDLEY, Martin R.; MASTANA, Sarabjit S.; NIMMO, Myra A. **The anti-inflammatory effects of exercise: Mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease** **Nature Reviews Immunology** Nat Rev Immunol, , 2011. DOI: 10.1038/nri3041.

GOLDSTEIN, Jerome; SILBERSTEIN, Stephen D.; SAPER, Joel R.; RYAN, Robert E. Jr; LIPTON, Richard B. Acetaminophen, aspirin, and caffeine in combination versus ibuprofen for acute migraine: results from a multicenter, double-blind, randomized, parallel-group, single-dose, placebo-controlled study. **Headache**, United States, v. 46, n. 3, p. 444–453, 2006. DOI: 10.1111/j.1526-4610.2006.00376.x.

GOLEMBIOWSKA, K; ZYLEWSKA, A. Adenosine receptors--the role in modulation of dopamine and glutamate release in the rat striatum. **Polish Journal of Pharmacology**, [*S. l.*], v. 49, n. 5, p. 317–22, 1997.

GRAHAM-PAULSON, Terri S.; PERRET, Claudio; WATSON, Phil; GOOSEY-TOLFREY, Victoria L. Improvement of sprint performance in wheelchair sportsmen with caffeine supplementation. **International Journal of Sports Physiology and**

- Performance**, [*S. l.*], v. 11, n. 2, p. 214–220, 2016. DOI: 10.1123/ijsp.2015-0073.
- GRAHAM, T. E.; HIBBERT, E.; SATHASIVAM, P. Metabolic and exercise endurance effects of coffee and caffeine ingestion. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, United States, v. 85, n. 3, p. 883–889, 1998. DOI: 10.1152/jappl.1998.85.3.883.
- GRAHAM, Terry E. Caffeine and exercise : metabolism , endurance and performance Caffeine and Exercise Metabolism , Endurance and Performance. **Sports Med**, [*S. l.*], n. February 2001, 2001.
- GRAHAM, Terry; GRAHAM, T. E.; SPRIET, L. L. Metabolic , catecholamine , and exercise performance responses to various doses of and exercise responses to various doses of caffeine. [*S. l.*], n. March, p. 867–874, 1995.
- GRANADOS-SOTO, Vinicio; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, Gilberto. A review of the pharmacokinetic and pharmacodynamic factors in the potentiation of the antinociceptive effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by caffeine. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [*S. l.*], v. 42, n. 2, p. 67–72, 1999. DOI: 10.1016/S1056-8719(00)00044-7.
- GREEN, J. Matt; OLENICK, Alyssa; EASTEP, Caroline; WINCHESTER, Lee. Caffeine influences cadence at lower but not higher intensity RPE-regulated cycling. **Physiology & behavior**, [*S. l.*], v. 169, p. 46–51, 2017. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.11.007.
- GREER, F.; MCLEAN, C.; GRAHAM, T. E. Caffeine, performance, and metabolism during repeated Wingate exercise tests. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, United States, v. 85, n. 4, p. 1502–1508, 1998. DOI:10.1152/jappl.1998.85.4.1502.
- GU, Lie; GONZALEZ, Frank J.; KALOW, Werner; TANG, Bing K. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. **Pharmacogenetics**, [*S. l.*], v. 2, n. 2, p. 73–77, 1992. DOI: 10.1097/00008571-199204000-00004.
- GUO, Haitao; CALLAWAY, Justin B.; TING, Jenny P. Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature medicine**, [*S. l.*], v. 21, n. 7, p. 677–687, 2015. DOI: 10.1038/nm.3893.
- HARDIE, D. Grahame; SAKAMOTO, Kei. **AMPK: A key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle** **Physiology**, 2006. DOI: 10.1152/physiol.00044.2005.
- HARLAND, Barbara F. Caffeine and nutrition. *In*: NUTRITION 2000, **Anais [...]**. [s.l.: s.n.] p. 522–526. DOI: 10.1016/S0899-9007(00)00369-5.

- HARNISH, Christopher R.; SABO, Roy T. Comparison of Two Different Sprint Interval Training Work-to-Rest Ratios on Acute Inflammatory Responses. **Sports medicine - open**, [S. l.], v. 2, p. 20, 2016. DOI: 10.1186/s40798-016-0044-1.
- HECKMAN, Melanie A.; WEIL, Jorge; GONZALEZ DE MEJIA, Elvira. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of food science**, United States, v. 75, n. 3, p. R77-87, 2010. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x.
- HELLSTEN, Y.; MACLEAN, D.; RÅDEGRAN, G.; SALTIN, B.; BANGSBO, J. Adenosine concentrations in the interstitium of resting and contracting human skeletal muscle. **Circulation**, United States, v. 98, n. 1, p. 6–8, 1998. DOI: 10.1161/01.cir.98.1.6.
- HERZIG, Sébastien; SHAW, Reuben J. **AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , 2018. DOI: 10.1038/nrm.2017.95.
- HESPEL, P.; RICHTER, E. A. Role of adenosine in regulation of carbohydrate metabolism in contracting muscle. **Advances in experimental medicine and biology**, United States, v. 441, p. 97–106, 1998. DOI: 10.1007/978-1-4899-1928-1_9.
- HIGGINS, Simon; STRAIGHT, Chad R.; LEWIS, Richard D. The Effects of Preexercise Caffeinated Coffee Ingestion on Endurance Performance: An Evidence-Based Review. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, United States, v. 26, n. 3, p. 221–239, 2016. DOI: 10.1123/ijsnem.2015-0147.
- HOFFMANN, Christoph; WEIGERT, Cora. Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: The Role of Myokines in Exercise Adaptations. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, [S. l.], v. 7, n. 11, 2017. DOI: 10.1101/cshperspect.a029793.
- HOLT, Richard I. G.; EROTKRITOU-MULLIGAN, Ioulietta; SÖNKSEN, Peter H. The history of doping and growth hormone abuse in sport. **Growth Hormone and IGF Research**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 320–326, 2009. DOI: 10.1016/j.ghir.2009.04.009.
- HORRIGAN, Louise A.; KELLY, John P.; CONNOR, Thomas J. Caffeine suppresses TNF- α production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 4, n. 10–11, p. 1409–1417, 2004. DOI: 10.1016/j.intimp.2004.06.005.
- HSIEH, I. Ni; CHANG, Anita Shin Yuan; TENG, Che Ming; CHEN, Chien Chih; YANG, Chia Ron. Aciculatrin inhibits lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide

synthase and cyclooxygenase-2 expression via suppressing NF- κ B and JNK/p38 MAPK activation pathways. **Journal of Biomedical Science**, [*S. l.*], v. 18, n. 1, p. 28, 2011. DOI: 10.1186/1423-0127-18-28.

HWANG, Ji Hyun; KIM, Kui Jin; RYU, Su Jung; LEE, Boo Yong. Caffeine prevents LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells and zebrafish. **Chemico-Biological Interactions**, [*S. l.*], v. 248, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.01.020.

JÄER, Sibylle; HANDSCHIN, Christoph; ST-PIERRE, Julie; SPIEGELMAN, Bruce M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*S. l.*], v. 104, n. 29, p. 12017–12022, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0705070104.

JAMES, J. E. Addiction Medicine: Science and Practice. *In*: BANKOLE A. JOHNSON, DSC, MD DEPARTMENTS OF PSYCHIATRY AND NEUROBEHAVIORAL SCIENCES, Medicine and Neuroscience University of Virginia (org.). **Springer**. New York: Springer-Verlag, 2011. p. 551–583. DOI: 10.1007/978-1-4419-03389_26.

JAMES, Rob S.; KOHLSDORF, Tiana; COX, Val M.; NAVAS, Carlos A. 70 micromM caffeine treatment enhances in vitro force and power output during cyclic activities in mouse extensor digitorum longus muscle. **European journal of applied physiology**, [*S. l.*], v. 95, n. 1, p. 74–82, 2005. DOI: 10.1007/s00421-005-1396-2.

JENSEN, Thomas E.; ROSE, Adam J.; HELLSTEN, Ylva; WOJTASZEWSKI, Jørgen F. P.; RICHTER, Erik A. Caffeine-induced Ca(2+) release increases AMPK-dependent glucose uptake in rodent soleus muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, [*S. l.*], v. 293, n. 1, p. E286-92, 2007. DOI: 10.1152/ajpendo.00693.2006.

KALMAR, Jayne M.; CAFARELLI, E. Central fatigue and transcranial magnetic stimulation: Effect of caffeine and the confound of peripheral transmission failure. **Journal of Neuroscience Methods**, [*S. l.*], v. 138, n. 1–2, p. 15–26, 2004. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2004.03.006.

KAMIMORI, Gary H.; KARYEKAR, Chetan S.; OTTERSTETTER, Ronald; COX, Donna S.; BALKIN, Thomas J.; BELENKY, Gregory L.; EDDINGTON, Natalie D. The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. **International Journal of Pharmaceutics**,

- [*S. l.*], v. 234, n. 1–2, p. 159–167, 2002. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00958-9.
- KASPAR, Felix; JELINEK, Herbert F.; PERKINS, Steven; AL-AUBAIDY, Hayder A.; DEJONG, Bev; BUTKOWSKI, Eugene. Acute-Phase Inflammatory Response to Single-Bout HIIT and Endurance Training: A Comparative Study. **Mediators of Inflammation**, [*S. l.*], v. 2016, 2016. DOI: 10.1155/2016/5474837.
- KESSEY, K.; MOGUL, D. J. Adenosine A2 receptors modulate hippocampal synaptic transmission via a cyclic-AMP-dependent pathway. **Neuroscience**, [*S. l.*], v. 84, n. 1, p. 59–69, 1998. DOI: 10.1016/S0306-4522(97)00504-6.
- KOGURE, Akinori et al. Effects of caffeine on the uncoupling protein family in obese yellow KK mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [*S. l.*], v. 29, n. 5–6, p. 391–394, 2002. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2002.03675.x.
- KOLAHDOUZAN, Mahshad; HAMADEH, Mazen J. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. **CNS neuroscience & therapeutics**, [*S. l.*], v. 23, n. 4, p. 272–290, 2017. DOI: 10.1111/cns.12684.
- KÖROĞLU, Ozge A.; MACFARLANE, Peter M.; BALAN, Kannan V; ZENEBE, Woineshet J.; JAFRI, Anjum; MARTIN, Richard J.; KC, Prabha. Anti-inflammatory effect of caffeine is associated with improved lung function after lipopolysaccharide-induced amnionitis. **Neonatology**, [*S. l.*], v. 106, n. 3, p. 235–240, 2014. DOI: 10.1159/000363217.
- KRAEMER, William J.; RATAMESS, Nicholas A. **Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training** *Sports Medicine* *Sports Med*, , 2005. DOI: 10.2165/00007256-200535040-00004.
- LANG, Charles H.; SILVIS, Christine; DESHPANDE, Nobuko; NYSTROM, Gerald; FROST, Robert A. Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. **Shock (Augusta, Ga.)**, United States, v. 19, n. 6, p. 538–546, 2003. DOI: 10.1097/01.shk.0000055237.25446.80.
- LATINI, Serena; PEDATA, Felicita. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, [*S. l.*], v. 79, n. 3, p. 463–484, 2001. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00607.x.
- LEE, Elaine C.; FRAGALA, Maren S.; KAVOURAS, Stavros A.; QUEEN, Robin M.; PRYOR, John Luke; CASA, Douglas J. Biomarkers in Sports and Exercise: Tracking

- Health, Performance, and Recovery in Athletes. **Journal of strength and conditioning research**, [S. l.], v. 31, n. 10, p. 2920–2937, 2017. DOI: 10.1519/JSC.0000000000002122.
- LEONARD, T. K.; WATSON, R. R.; MOHS, M. E. **The effects of caffeine on various body systems: A review** *Journal of the American Dietetic Association*, 1987.
- LONDOS, C.; COOPER, D. M. F.; WOLFF, J. Subclasses of external adenosine receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 77, n. 5, p. 2551–2554, 1980. DOI: 10.1073/pnas.77.5.2551.
- LOPES, J. M.; AUBIER, M.; JARDIM, J.; ARANDA, J. V.; MACKLEM, P. T. Effect of caffeine on skeletal muscle function before and after fatigue. **Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**, United States, v. 54, n. 5, p. 1303–1305, 1983. DOI: 10.1152/jappl.1983.54.5.1303.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. DOI: 10.1016/0922-338X(96)89160-4.
- LYNGE, J.; HELLSTEN, Y. Distribution of adenosine A1, A2A and A2B receptors in human skeletal muscle. **Acta physiologica Scandinavica**, England, v. 169, n. 4, p. 283–290, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-201x.2000.00742.x.
- MACEDO, Denise Vaz. Exercício físico , processo inflamatório e adaptação : uma visão geral. [S. l.], p. 320–328, 1980. DOI: 10.5007/1980-0037.2011v13n4p320.
- MAGKOS, Faidon; KAVOURAS, Stavros A. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 45, n. 7–8, p. 535–562, 2005. DOI: 10.1080/1040-830491379245.
- MARTINS, Roberta de Paula et al. Neopterin preconditioning prevents inflammasome activation in mammalian astrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. in press, n. March, 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.022.
- MEDZHITOV, Ruslan. **Origin and physiological roles of inflammation** *Nature* Nature Publishing Group, , 2008. DOI: 10.1038/nature07201.
- MEEUSEN, Romain; ROELANDS, Bart; SPRIET, Lawrence L. Caffeine, exercise and the brain. **Nestle Nutrition Institute Workshop Series**, [S. l.], v. 76, p. 1–12, 2013. DOI: 10.1159/000350223.
- MEEUSEN, Romain; THORRÉ, Katrien; CHAOULOFF, Francis; SARRE, Sophie; DE

MEIRLEIR, Kenny; EBINGER, Guy; MICHOTTE, Yvette. Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats. **Brain Research**, [S. l.], v. 740, n. 1–2, p. 245–252, 1996. DOI: 10.1016/S0006-8993(96)00872-4.

MINOKOSHI, Yasuhiko; KIM, Young Bum; PERONI, Odile D.; FRYER, Lee G. D.; MÜLLER, Corinna; CARLING, David; KAHN, Barbara B. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature**, [S. l.], v. 415, n. 6869, p. 339–343, 2002. DOI: 10.1038/415339a.

MOTTRAM, D. R. **Banned drugs in sport: Does the International Olympic Committee (IOC) list need updating?** *Sports Medicine* Sports Med, , 1999. DOI: 10.2165/00007256-199927010-00001.

MOUNIER, Rémi; THÉRET, Marine; LANTIER, Louise; FORETZ, Marc; VIOLLET, Benoit. Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 275–86, 2015. DOI: 10.1016/j.tem.2015.02.009.

NALL, Aleksandra H.; SHAKHMANTSIR, Iryna; CICHEWICZ, Karol; BIRMAN, Serge; HIRSH, Jay; SEHGAL, Amita. Caffeine promotes wakefulness via dopamine signaling in *Drosophila*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, 2016. DOI: 10.1038/srep20938.

NARKAR, Vihang A. et al. AMPK and PPAR δ Agonists Are Exercise Mimetics. **Cell**, [S. l.], v. 134, n. 3, p. 405–415, 2008. DOI: 10.1016/j.cell.2008.06.051.

NEHLIG, Astrid. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 70, n. 2, p. 384–411, 2018. DOI: 10.1124/pr.117.014407.

NESTOR, Colm E. et al. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. **Genome research**, United States, v. 22, n. 3, p. 467–477, 2012. DOI: 10.1101/gr.126417.111.

OKADA, Motohiro; MIZUNO, Kazuhisa; KANEKO, Sunao. Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 212, n. 1, p. 53–56, 1996. DOI: 10.1016/0304-3940(96)12780-4.

OKADA, Motohiro; NUTT, David J.; MURAKAMI, Takuya; ZHU, Gang; KAMATA, Akihisa; KAWATA, Yuko; KANEKO, Sunao. Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. **Journal of**

Neuroscience, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 628–640, 2001. DOI: 10.1523/jneurosci.21-02-00628.2001.

ONGINI, Ennio; FREDHOLM, Bertil B. Pharmacology of adenosine A2A receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 364–372, 1996. DOI: 10.1016/s0165-6147(96)80010-1.

PAGALA, M. K.; TAYLOR, S. R. Imaging caffeine-induced Ca²⁺ transients in individual fast-twitch and slow-twitch rat skeletal muscle fibers. **The American journal of physiology**, United States, v. 274, n. 3, p. C623-32, 1998. DOI: 10.1152/ajpcell.1998.274.3.C623.

PEAKE, Jonathan M.; GATTA, Paul Della; SUZUKI, Katsuhiko; NIEMAN, David C. **Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: Regulatory mechanisms and exercise effects** *Exercise Immunology Review* Association for the Advancement of Sports Medicine, , 2015.

PEDERSEN, Bente K.; FEBBRAIO, Mark A. **Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6** *Physiological Reviews*, 2008. DOI: 10.1152/physrev.90100.2007.

PEDERSEN, Bente Klarlund. Muscles and their myokines. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 214, n. 2, p. 337–346, 2011. DOI: 10.1242/jeb.048074.

PURI, Basant K.; HEARD, Christopher R.; MONRO, Jean A. Is there a sex difference in adult salivary clearance of caffeine (1,3,7-trimethylpurine-2,6-dione)? **Journal of oral biology and craniofacial research**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 20–22, 2020. DOI: 10.1016/j.jobcr.2020.01.010.

QUIRÓS, Pedro M.; MOTTIS, Adrienne; AUWERX, Johan. Mitonuclear communication in homeostasis and stress. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 213–226, 2016. DOI: 10.1038/nrm.2016.23.

RAHMAN, Arshad; FAZAL, Fabeha. Blocking NF-κB: An inflammatory issue. *In: PROCEEDINGS OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY 2011, Anais [...]. : Proc Am Thorac Soc*, 2011. p. 497–503. DOI: 10.1513/pats.201101-009MW. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22052926/>. Acesso em: 22 jan. 2021.

RALEVIC, V; BURNSTOCK, Geoffrey. Receptor for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 50, n. September, p. 413–492, 1998.

RANEY, Marcella A.; TURCOTTE, Lorraine P. Evidence for the involvement of

- CaMKII and AMPK in Ca²⁺-dependent signaling pathways regulating FA uptake and oxidation in contracting rodent muscle. **J Appl Physiol**, [S. l.], v. 0652, n. 104, p. 1366–1373, 2008. DOI: 10.1152.
- RAWAT, Rashmi; COHEN, Tatiana V; AMPONG, Beryl; FRANCIA, Dwight; HENRIQUES-PONS, Andrea; HOFFMAN, Eric P.; NAGARAJU, Kanneboyina. Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. **The American journal of pathology**, [S. l.], v. 176, n. 6, p. 2891–2900, 2010. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090058.
- REES, D. A.; SCANLON, M. F.; HAM, J. **Adenosine signalling pathways in the pituitary gland: One ligand, multiple receptors** *Journal of Endocrinology* *J Endocrinol*, , 2003. DOI: 10.1677/joe.0.1770357.
- RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M.; DE MENDONÇA, A. **Participation of adenosine receptors in neuroprotection** *Drug News and Perspectives* *Drug News Perspect*, , 2003. DOI: 10.1358/dnp.2003.16.2.740246.
- RICHARDSON, Alan J.; RELF, Rebecca L.; SAUNDERS, Arron; GIBSON, Oliver R. Similar Inflammatory Responses following Sprint Interval Training Performed in Hypoxia and Normoxia. **Frontiers in physiology**, [S. l.], v. 7, p. 332, 2016. DOI: 10.3389/fphys.2016.00332.
- RODAS, Lluís; MARTINEZ, Sonia; AGUILO, Antoni; TAULER, Pedro. Caffeine supplementation induces higher IL-6 and IL-10 plasma levels in response to a treadmill exercise test. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 47, 2020. DOI: 10.1186/s12970-020-00375-4.
- ROSSI, Fabrício Eduardo; PANISSA, Valéria Leme Gonçalves; MONTEIRO, Paula Aulves; GEROSA-NETO, José; CAPERUTO, Érico Chagas; CHOLEWA, Jason Michael; ZAGATTO, Alessandro Moura; LIRA, Fábio Santos. Caffeine supplementation affects the immunometabolic response to concurrent training. **Journal of Exercise Rehabilitation**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 179–184, 2017. DOI: 10.12965/jer.1734938.445.
- ROUSSEAU, Eric; LADINE, Jeffrey; LIU, Qi Yi; MEISSNER, Gerhard. Activation of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 267, n. 1, p. 75–86, 1988. DOI: 10.1016/0003-9861(88)90010-0.
- RUDERMAN, Neil B. et al. **Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein**

kinase: Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndromeDiabetes American Diabetes Association Inc., , 2006. DOI: 10.2337/db06-S007.

RYU, S.; CHOI, S. K.; JOUNG, S. S.; SUH, H.; CHA, Y. S.; LEE, S.; LIM, K. Caffeine as a lipolytic food component increases endurance performance in rats and athletes. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 139–146, 2001. DOI: 10.3177/jnsv.47.139.

SANTOS, Victor G. F.; SANTOS, Vander R. F.; FELIPPE, Leandro J. C.; JR, Jose W. Almeida; BERTUZZI, Rômulo; KISS, Maria A. P. D. M.; LIMA-SILVA, Adriano E. Caffeine Reduces Reaction Time and Improves Performance in Simulated-Contest of Taekwondo. [S. l.], p. 637–649, 2014. DOI: 10.3390/nu6020637.

SAWYNOK, J.; YAKSH, T. L. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. **Pharmacological reviews**, United States, v. 45, n. 1, p. 43–85, 1993.

SAWYNOK, Jana. **Pharmacological Rationale for the Clinical Use of Caffeine**Drugs, , 1995. DOI: 10.2165/00003495-199549010-00004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7705215/>. Acesso em: 18 jan. 2021.

SAWYNOK, Jana. Methylxanthines and pain. **Handbook of experimental pharmacology**, Germany, n. 200, p. 311–329, 2011. DOI: 10.1007/978-3-642-13443-2_11.

SCHEFFER, Débora da Luz; GHISONI, Karina; AGUIAR, Aderbal Silva; LATINI, Alexandra. Moderate running exercise prevents excessive immune system activation. **Physiology and Behavior**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1016/j.physbeh.2019.02.023.

SCHEFFER, Débora da Luz; LATINI, Alexandra. **Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs***Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*Elsevier B.V., , 2020. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.165823.

SCHMIDT, Barbara; ROBERTS, Robin S.; DAVIS, Peter; DOYLE, Lex W.; BARRINGTON, Keith J.; OHLSSON, Arne; SOLIMANO, Alfonso; TIN, Win. Caffeine therapy for apnea of prematurity. **The New England journal of medicine**, United States, v. 354, n. 20, p. 2112–2121, 2006. DOI: 10.1056/NEJMoa054065.

SCHNEIKER, Knut Thomas; BISHOP, David; DAWSON, Brian; HACKETT, Laurence

Peter. Effects of Caffeine on Prolonged Intermittent- Sprint Ability in Team-Sport Athletes. *[S. l.]*, p. 578–585, 2006. DOI: 10.1249/01.mss.0000188449.18968.62.

SILINSKY, Eugene M. Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. **The Journal of physiology**, *[S. l.]*, v. 558, n. Pt 2, p. 389–401, 2004. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.061457.

SKINNER, Tina L.; JENKINS, David G.; COOMBES, Jeff S.; TAAFFE, Dennis R.; LEVERITT, Michael D. Dose response of caffeine on 2000-m rowing performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, *[S. l.]*, v. 42, n. 3, p. 571–576, 2010. DOI: 10.1249/MSS.0b013e3181b6668b.

SMITH, Lucille Lakier. **Cytokine hypothesis of overtraining: A physiological adaptation to excessive stress?** **Medicine and Science in Sports and Exercise** American College of Sports Medicine, , 2000. DOI: 10.1097/00005768-200002000-00011.

SOEREN, M. H. V. A. N.; GRAHAM, T. E. Effect of caffeine on metabolism , exercise endurance , and catecholamine responses after withdrawal. *[S. l.]*, p. 1493–1501, 1998.

SÖKMEN, Bülent; ARMSTRONG, Lawrence E.; KRAEMER, William J.; CASA, Douglas J.; DIAS, Joao C.; JUDELSON, Daniel A.; MARESH, Carl M. Caffeine use in sports: Considerations for the athlete. **Journal of Strength and Conditioning Research**, *[S. l.]*, v. 22, n. 3, p. 978–986, 2008. DOI: 10.1519/JSC.0b013e3181660cec.

SOLINAS, Marcello; FERRÉ, Sergi; YOU, Zhi Bing; KARCZ-KUBICHA, Marzena; POPOLI, Patrizia; GOLDBERG, Steven R. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. **Journal of Neuroscience**, *[S. l.]*, v. 22, n. 15, p. 6321–6324, 2002. DOI: 10.1523/jneurosci.22-15-06321.2002.

SOUTHWARD, Kyle; RUTHERFURD-MARKWICK, Kay J.; ALI, Ajmol. The Effect of Acute Caffeine Ingestion on Endurance Performance: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, New Zealand, v. 48, n. 8, p. 1913–1928, 2018. DOI: 10.1007/s40279-018-0939-8.

STEAR, S. J.; CASTELL, L. M.; BURKE, L. M.; SPRIET, L. L.; BURKE, L. M.; SPRIET, L. L. BJSM reviews : A – Z of nutritional supplements : dietary supplements , sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance Part 6. **Br J Sports Med**, *[S. l.]*, v. 44, n. 4, p. 297–299, 2010. DOI: 10.1136/bjism.2010.071621.

STEENBERG, Adam; FISCHER, Christian P.; KELLER, Charlotte; MØLLER,

Kirsten; PEDERSEN, Bente Klarlund. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 285, n. 2 48-2, 2003. DOI: 10.1152/ajpendo.00074.2003.

STOTT, D. I. **Immunoblotting and dot blotting** **Journal of Immunological Methods** Elsevier, , 1989. DOI: 10.1016/0022-1759(89)90394-3.

SUN, Wan-Chun; MOORE, James N.; HURLEY, David J.; VANDENPLAS, Michel L.; LINDEN, Joel; CAO, Zhengyu; MURRAY, Thomas F. Adenosine A2A receptor agonists inhibit lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor-alpha by equine monocytes. **Veterinary immunology and immunopathology**, Netherlands, v. 121, n. 1–2, p. 91–100, 2008. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.08.011.

SWART, J.; LAMBERTS, R. P.; LAMBERT, M. I.; ST CLAIR GIBSON, A.; LAMBERT, E. V.; SKOWNO, J.; NOAKES, T. D. Exercising with reserve: Evidence that the central nervous system regulates prolonged exercise performance. **British Journal of Sports Medicine**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 782–788, 2009. DOI: 10.1136/bjism.2008.055889.

TALLIS, Jason; JAMES, Rob S.; COX, Val M.; DUNCAN, Michael J. The effect of physiological concentrations of caffeine on the power output of maximally and submaximally stimulate stimulated mouse EDL (fast) and soleus (slow) muscle. **J Appl Physiol**, [S. l.], n. June 2014, 2012. DOI: 10.1152/jappphysiol.00801.2011.

TARNOPOLSKY, Mark A. SYMPOSIUM / SYMPOSIUM Effect of caffeine on the neuromuscular system — potential as an ergogenic aid. **Appl Physiol Nutr Metab**, [S. l.], p. 1284–1289, 2008. a. DOI: 10.1139/H08-121.

TARNOPOLSKY, Mark A. Effect of caffeine on the neuromuscular system--potential as an ergogenic aid. **Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme**, Canada, v. 33, n. 6, p. 1284–1289, 2008. b. DOI: 10.1139/H08-121.

TAULER, Pedro; MARTINEZ, Sonia; MARTINEZ, Pau; LOZANO, Leticia; MORENO, Carlos; AGUILÓ, Antoni. Effects of caffeine supplementation on plasma and blood mononuclear cell interleukin-10 levels after exercise. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 8–16, 2016. DOI: 10.1123/ijsnem.2015-0052.

TAULER, Pedro; MARTÍNEZ, Sonia; MORENO, Carlos; MONJO, Marta;

- MARTÍNEZ, Pau; AGUILÓ, Antoni. Effects of caffeine on the inflammatory response induced by a 15-km run competition. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [*S. l.*], v. 45, n. 7, p. 1269–1276, 2013. DOI: 10.1249/MSS.0b013e3182857c8a.
- TAVARES, Cristiane; SAKATA, Rioko Kimiko. Cafeína para o Tratamento de Dor. [*S. l.*], 2012.
- TREVILATTO, P. C.; LINE, S. R. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. **The Journal of forensic odonto-stomatology**, Australia, v. 18, n. 1, p. 6–9, 2000.
- TSUDA, Satoshi; EGAWA, Tatsuro; KITANI, Kazuto; OSHIMA, Rieko; MA, Xiao; HAYASHI, Tatsuya. Caffeine and contraction synergistically stimulate 5 0 -AMP-activated protein kinase and insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscle. **Physiological Reports**, [*S. l.*], v. 3, n. 10, p. 1–12, 2015. DOI: 10.14814/phy2.12592.
- UNTERGASSER, Andreas; CUTCUTACHE, Ioana; KORESSAAR, Triinu; YE, Jian; FAIRCLOTH, Brant C.; REMM, Mairo; ROZEN, Steven G. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, England, v. 40, n. 15, p. e115, 2012. DOI: 10.1093/nar/gks596.
- VAN THUYNE, W.; DELBEKE, F. T. Distribution of caffeine levels in urine in different sports in relation to doping control before and after the removal of caffeine from the WADA doping list. **International journal of sports medicine**, Germany, v. 27, n. 9, p. 745–750, 2006. DOI: 10.1055/s-2005-872921.
- VELEY, V. H., And A. D. Waller. On the comparative Toxicity of Theobtomine and Caffeine, as Measured by Their Direct Effect upon Contractility of Isolate Muscle. **Royal Society of London**, [*S. l.*], v. 82, n. sep 9, p. 568–574, 1910.
- VOLKOW, N. D. et al. Caffeine increases striatal dopamine D2/D3 receptor availability in the human brain. **Translational Psychiatry**, [*S. l.*], v. 5, n. 4, p. e549, 2015. DOI: 10.1038/tp.2015.46.
- WALDVOGEL, Siegfried R. **Caffeine - A drug with a surprise** *Angewandte Chemie - International Edition* *Angew Chem Int Ed Engl*, , 2003. DOI: 10.1002/anie.200390173.
- WALKER, Gary J.; DZIUBAK, Anneliese; HOUGHTON, Laurence; PRENDERGAST, Ciaran; LIM, Laura; BISHOP, Nicolette C. The effect of caffeine ingestion on human neutrophil oxidative burst responses following time-trial cycling. **Journal of Sports Sciences**, [*S. l.*], v. 26, n. 6, p. 611–619, 2008. DOI: 10.1080/02640410701654306.

WATSON, Phillip; HASEGAWA, Hiroshi; ROELANDS, Bart; PIACENTINI, Maria Francesca; LOOVERIE, Roel; MEEUSEN, Romain. Acute dopamine/noradrenaline reuptake inhibition enhances human exercise performance in warm, but not temperate conditions. **Journal of Physiology**, [S. l.], v. 565, n. 3, p. 873–883, 2005. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.079202.

WOJTASZEWSKI, Jørgen F. P.; NIELSEN, Pernille; HANSEN, Bo F.; RICHTER, Erik A.; KIENS, Bente. Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**, [S. l.], v. 528, n. 1, p. 221–226, 2000. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00221.x.

WOOD, P. L.; KIM, Helen S.; BOYAR, W. C.; HUTCHISON, A. Inhibition of nigrostriatal release of dopamine in the rat by adenosine receptor agonists: A1 receptor mediation. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 21–25, 1989. DOI: 10.1016/0028-3908(89)90062-2.

YAAR, R.; JONES, M. R.; CHEN, J. F.; RAVID, Katya. Animal models for the study of adenosine receptor function. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 202, n. 1, p. 9–20, 2005. DOI: 10.1002/jcp.20138.

YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 1288–1295, 2002. DOI: 10.1038/nm788.

ZHAO, Weiming; MA, Li; CAI, Cheng; GONG, Xiaohui. Caffeine Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation by Suppressing MAPK/NF- κ B and A2aR Signaling in LPS-Induced THP-1 Macrophages. **International journal of biological sciences**, [S. l.], v. 15, n. 8, p. 1571–1581, 2019. DOI: 10.7150/ijbs.34211.

ZHENG, Xinyan; TAKATSU, Satomi; WANG, Hongli; HASEGAWA, Hiroshi. Acute intraperitoneal injection of caffeine improves endurance exercise performance in association with increasing brain dopamine release during exercise. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 122, p. 136–143, 2014. DOI: 10.1016/j.pbb.2014.03.027.

ZHONG, Hongyan; BELARDINELLI, Luiz; MAA, Tenning; ZENG, Dewan. Synergy between A2B adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 2–8, 2005. DOI: 10.1165/rcmb.2004-0103OC.

