



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**JÚLIA MARIA TONIN GEISS**

**EFEITO DA LUTEÍNA SOBRE O DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO  
POR ETANOL EM RATOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MEDIANEIRA  
2016**

**JÚLIA MARIA TONIN GEISS**

**EFEITO DA LUTEÍNA SOBRE O DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO  
POR ETANOL EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTA – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná/UTFPR, Câmpus Medianeira.

Discente: Júlia Maria Tonin Geiss

Orientador: Dr. Gustavo Petri Guerra

Coorientador: Dra. Sara Cristina Sagae

**MEDIANEIRA  
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

G313e Geiss, Julia Maria Tonin

Efeito da luteína sobre o déficit de memória induzido por etanol em ratos / Julia Maria Tonin Geiss – 2016.  
101 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Gustavo Petri Guerra.

Coorientadora: Sara Cristina Sagae.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2016.

Inclui bibliografias.

1. Carotenóides. 2. Álcool – Efeito fisiológico. 3. Alimentos – Dissertações. I. Guerra, Gustavo Petri, orient. II. Sagae, Sara Cristina, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira  
Marci Lucia Nicodem Fischborn CRB 9/1219



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **EFEITO DA LUTEÍNA SOBRE O DÉFICIT DE MEMÓRIA INDUZIDO POR ETANOL EM RATOS**

Por

**JÚLIA MARIA TONIN GEISS**

Essa dissertação foi apresentada às catorze horas, do dia dois de maio de dois mil e dezesseis, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

---

Prf. Dr. Gustavo Petri Guerra (Orientador – PPGTA)

---

Prf. Dr. Rafael Porto Ineu (Membro Externo – UTFPR Câmpus Campo Mourão)

---

Prf. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti (Membro Externo – UNICENTRO)

“O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa”.

## **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos são acima de tudo ao meu pai Adão Geiss já falecido e amado por sua família, que sempre me apoiou na busca incansável do conhecimento e não mediu esforços em mostrar a importância do estudo, do perdão, do respeito e do amor em nossas vidas.

Também, à minha mãe Belonir Salete Tonin Geiss e minha irmã Cássia Regina Geiss Zimmermann que me apoiaram incondicionalmente e em momentos que muitos teriam duvidado.

E por fim, ao meu Orientador Gustavo Petri Guerra que foi o idealizador deste projeto, de quem adquiri uma grande admiração e que também me inspirou profundamente para os caminhos que trilharei daqui para frente.

## RESUMO

GEISS, Júlia M. T. Efeito da luteína sobre o déficit de memória induzido por etanol em ratos. 2016. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, PR, 2016.

A exposição aguda, sub-crônica ou crônica ao etanol está envolvida com diversos problemas que afetam o cérebro e o sistema nervoso central, provocando déficits de aprendizagem e memória de curto ou longo prazo. Compostos bioativos como carotenoides, são novas opções terapêuticas capazes de reduzir os déficits de memória e atuar na redução do risco de doenças e manutenção da saúde. Neste sentido, a luteína, um carotenoide que contribui contra o estresse oxidativo, pode atuar como uma droga capaz de modificar ou atenuar os danos neuronais e os déficits de memória induzidos por etanol. Assim, no presente estudo foi avaliado o efeito da luteína sobre os déficits de memória induzidos por etanol em ratos na tarefa de reconhecimento de objetos. Os resultados encontrados demonstraram que a administração de luteína (100 mg/kg) melhorou a memória dos ratos na tarefa de reconhecimento de objetos [ $F_{(3,34)} = 7,13$ ;  $p < 0,05$ ], enquanto as doses de 15 ou 50 mg/kg não apresentaram efeito; a administração sub-crônica de etanol (3 g/kg) causou déficit de memória em ratos na tarefa de reconhecimento de objetos [ $F_{(3,37)} = 3,06$ ;  $p < 0,05$ ]; e a de luteína (50 mg/kg) preveniu o déficit de memória induzido pelo etanol [ $F_{(3,39)} = 7,64$ ;  $p < 0,05$ ]. Além disso, a administração de luteína, etanol e a combinação luteína e etanol não alteraram os parâmetros de estresse oxidativo avaliados no córtex e hipocampo. Sugerindo que a prevenção do déficit de memória induzido por etanol não envolve estresse oxidativo no córtex e hipocampo. Assim, baseado nos resultados obtidos, a luteína pode ser considerada uma alternativa no tratamento dos déficits de memória induzidos por etanol, entretanto, mais estudos são necessários para avaliar o mecanismo envolvido neste efeito.

**Palavras-chave:** carotenoides, reconhecimento de objetos, déficit cognitivo, estresse oxidativo, álcool.

## ABSTRACT

GEISS, Júlia M. T. Lutein prevents ethanol-induced memory deficit in rats. 2016. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, PR, 2016.

The acute exposure, sub-acute or chronic is involved with various problems affecting the brain and central nervous system, resulting in learning deficits and short or long-term memory. Bioactive compounds such as carotenoids, are new therapeutic options able to reduce memory deficits and act in reducing the risk of diseases and health maintenance. In this sense, lutein, a carotenoid that contributes against oxidative stress, can act as a drug able to modify or reduce neuronal damage and memory deficits induced by ethanol. Thus, this study evaluated the effect of lutein on memory deficits in rats induced by ethanol in the object recognition task. The results showed that lutein administration (100 mg/kg) improved the memory of rats in the recognition task objects [ $F_{(3,34)} = 7.13$ ;  $p < 0.05$ ], while doses of 15 or 50 mg / kg showed no effect; the sub-chronic administration of ethanol (3 g/kg) caused memory deficit in rats recognition task objects [ $F_{(3,37)} = 3.06$ ;  $p < 0.05$ ]; and lutein (50 mg/kg) prevents the memory deficit induced by ethanol [ $F_{(3,39)} = 7.64$ ;  $p < 0.05$ ]. Furthermore, lutein administration, ethanol and combination lutein and ethanol did not change the parameters of oxidative stress evaluated in the cortex and hippocampus. This suggests that the prevention of memory deficits induced by ethanol does not involve oxidative stress in the cortex and hippocampus. Thus, based on the results obtained, lutein may be considered an alternative in the treatment of memory deficits induced by ethanol, however, more studies are needed to evaluate the mechanism involved in this effect.

**Key-words:** carotenoids, object recognition, cognitive deficit, oxidative stress, alcohol.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DA MEMÓRIA.....	16
FIGURA 2 - ESTRUTURAS DO LOBO TEMPORAL (HIPOCAMPO E CÓRTEX) ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA. A) O CÉREBRO SECCIONADO CORONALMENTE PARA MOSTRAR O HIPOCAMPO E O CÓRTEX NO LOBO TEMPORAL. B) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO HIPOCAMPO E SEUS MICROCIRCUITOS.....	18
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOPRENO .....	26
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS CAROTENOIDES LICOPENO E $\beta$ -CAROTENO.....	26
FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DA LUTEÍNA .....	28
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL: CURVA DOSE-EFEITO DE LUTEÍNA.....	36
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL: CURVA DOSE-EFEITO DE ETANOL.....	37
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL: ADMINISTRAÇÃO DE LUTEÍNA E ETANOL.....	38



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADH.	Álcool desidrogenase
ALDH.	Aldeído desidrogenase
AMPc.	Adenosina monofosfato cíclico
CA.	Corno de Amon
CAT.	Catalase
COX-2.	Ciclooxigenase 2
CREB.	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
DTNB.	Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)
EROs.	Espécies reativas de oxigênio
GPx.	Glutaciona peroxidase
GSH.	Glutaciona reduzida
HDL.	Lipoproteína de alta densidade
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	Peróxido de hidrogênio
HOCl.	Ácido hipocloroso
iNOS.	Óxido nítrico sintase induzível
LDL.	Lipoproteína de baixa densidade
MDA.	Malondialdeido
NAD <sup>+</sup> .	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH.	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido
NF-kB.	Fator nuclear kappa-B
NO <sup>•</sup> .	Óxido nítrico
3-NP.	Ácido 3-nitropropiónico
NPSH.	Tíol não proteico
O <sub>3</sub> .	Ozônio
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> .	Oxigênio singlete
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .	Ânion superóxido
O <sub>2</sub> .	Oxigênio molecular
OH <sup>•</sup> .	Hidroxila
ROO <sup>•</sup> .	Peroxila
SDS.	Dodecil sulfato de sódio
SOD.	Superóxido dismutase
TBA.	Ácido tiobarbitúrico

TBARS. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA. Ácido tricloroacético

UV. Ultra violeta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 OBJETIVOS .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.1.1 Objetivos Específicos .....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
3.1 MEMÓRIA .....	15
3.1.1 Hipocampo e córtex.....	16
3.2 ETANOL.....	19
3.2.1 Estresse oxidativo .....	21
3.2.2 Déficit de memória induzido por etanol .....	23
3.3 CAROTENOIDES.....	25
3.3.1 Luteína .....	27
3.3.1.1 Estrutura química e metabolismo .....	27
3.3.1.2 Efeitos protetores e mecanismo de ação .....	29
3.4 LUTEÍNA E MEMÓRIA.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.1 ANIMAIS E REAGENTES .....	33
4.2 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS .....	33
4.3 DETERMINAÇÃO DOS INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	34
4.3.1 Preparação dos tecidos.....	34
4.3.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	34
4.3.3 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). 35	
4.3.4 Tiól não proteico (NPSH).....	35
4.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	36
4.4.1 Experimento 1 - Efeito da luteína sobre o desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos .....	36
4.4.2 Experimento 2 - Efeito da administração sub-crônica de etanol sobre o desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos.....	36
4.4.3. Experimento 3 - Efeito da luteína sobre o déficit de memória e indicadores de estresse oxidativo induzidos pela administração sub-crônica de etanol .....	37
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
Artigo 1 – Lutein prevents ethanol-induced memory deficit in rats .....	62
7 CONCLUSÕES GERAIS.....	101

## 1. INTRODUÇÃO

A intoxicação e a dependência pelo álcool é um dos maiores problemas de saúde pública. O álcool é uma das drogas mais utilizadas no mundo (SHER, 2006), sendo que, em 2014 nos Estados Unidos, 87,6 % das pessoas relatam consumo de álcool em algum momento de suas vidas e cerca de 16,3 milhões de adultos apresentaram algum transtorno decorrente deste uso (SAMHSA, 2014). O consumo abusivo do etanol está relacionado com o aumento do risco de doenças hepáticas (MCCULLOUGH; O'SHEA; DASARATHY, 2011), distúrbios neuropsiquiátricos (RIVAS et al., 2013), doenças cardiovasculares, doenças digestivas e também com o câncer (CORRAO et al., 2000).

Embora os efeitos ocorram, praticamente, em todos os tecidos e órgãos do corpo, o cérebro é considerado um dos principais alvos do excesso de álcool no organismo, podendo sofrer alterações estruturais, funcionais (HARPER; MATSUMOTO, 2005; PFEFFERBAUM et al., 2010) e, em alguns casos, neurodegeneração (CREWS et al., 2004; CREWS; NIXON, 2009; PASCUAL et al., 2011).

Desta forma, a exposição excessiva ao etanol pode conduzir ao comprometimento no aprendizado e memória (CIPPITIELI et al., 2010a; 2010b), déficits na memória de curto a longo prazo (PASCUAL et al., 2011) e déficits neurocomportamentais de longa duração e comprometimento de processos cognitivos, refletidos na tarefa de reconhecimento de objetos, durante a exposição de etanol na juventude/adolescência de ratos (PASCUAL et al., 2007).

Por isso, considerando um aumento da prevalência de consumo excessivo de álcool, nos últimos anos, e que o controle ou proibição deste consumo é uma tarefa difícil, evitar disfunções que prejudiquem atividades cotidianas, assim como, a produtividade no trabalho ou nos estudos, torna-se importante.

Assim, estudos que contribuam para o desenvolvimento de tratamentos e novas opções terapêuticas capazes de evitar, reduzir ou eliminar déficits de memória induzidos por etanol, sendo eficazes, seguros, com baixo custo e que não apresentem efeitos colaterais, são de extrema importância para a sociedade. Neste sentido, evidências crescentes apontam para o importante papel dos compostos bioativos, constituintes extranutricionais presentes, principalmente, nos alimentos de origem vegetal, que atuam na manutenção da saúde e na redução do risco de

doenças, sem o surgimento de efeitos colaterais como no caso de algumas drogas farmacêuticas (ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007; KUSSMANN et al., 2007; REIN et al., 2013).

Evidências demonstram que compostos bioativos encontrados nos alimentos, como, carotenoides, vitaminas B, C, D e E, flavonoides, ácidos graxos polinsaturados, curcumina, piperina, entre outros, estão sendo estudados como alternativa para o tratamento de diversas doenças, como, o câncer, cardiovasculares, neurodegenerativas (JOSEPH et al., 2009; KAUR, CHAUHAN; SANDHIR, 2011; OBULESU; DOWLATHABAD; BRAMHACHARI, 2011; GILLETTE-GUYONNET; SECHER; VELLAS, 2013; MI et al., 2013; GUTIERRES et al., 2012; 2014). Existem, aproximadamente, 700 carotenoides, divididos em dois grandes grupos, os carotenos, que consistem em hidrocarbonetos puros, como o  $\beta$ -caroteno e licopeno; e as xantofilas, hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados, como luteína e zeaxantina (SIES; STAHL, 2003).

Algumas linhas de evidências demonstram que a luteína é um dos carotenoides envolvidos nos processos de aprendizado, memória e prevenção de doenças neurodegenerativas. Primeiro, a suplementação ou o consumo de uma dieta rica em fontes de luteína estão associadas às baixas taxas de declínio cognitivo decorrentes do envelhecimento (KANG; ASCHERIO; GRODSTEIN, 2005; JOHNSON et al., 2008; KESSE-GUYOT et al., 2014). Segundo, a luteína é o principal carotenoide encontrado no cérebro humano, com cerca de 30% da concentração total de carotenoides, além de apresentar capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, com captação preferencial sobre a maioria dos outros carotenoides e correlação positiva entre os níveis do soro e do cérebro (CRAFT et al., 2004; JOHNSON et al., 2013; VISHWANATHAN et al., 2014a). Terceiro, uma melhora na função cognitiva está associada com níveis aumentados de luteína no cérebro (JOHNSON et al., 2013). Quarto, indivíduos com déficit cognitivo leve (RINALDI et al., 2003; AKBARALY et al., 2007; JOHNSON et al., 2013) ou Doença de Alzheimer (RINALDI et al., 2003; WANG et al., 2008; KIKO et al., 2012; DIAS et al., 2014) possuem níveis de luteína reduzidos no plasma e no cérebro, quando comparados a indivíduos normais.

Assim, a luteína pode atuar como um alvo terapêutico no desenvolvimento de drogas capazes de modificar a evolução natural dos danos neuronais e déficits de memória induzidos por etanol, possibilitando identificar estratégias farmacológicas

eficazes para esse tratamento. Portanto, a realização deste trabalho é importante para determinar os efeitos da luteína, um possível candidato no tratamento dos déficits de memória induzidos por etanol.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da luteína sobre o déficit de memória induzido por etanol em ratos na tarefa de reconhecimento de objetos.

#### **2.1.1. Objetivos específicos**

- Induzir déficit de memória pela administração sub-crônica de etanol em ratos;
- Avaliar o efeito da luteína sobre a memória dos ratos;
- Avaliar o efeito da luteína sobre o déficit de memória induzido pela administração sub-crônica de etanol em ratos;
- Avaliar os indicadores de estresse oxidativo induzido pela administração sub-crônica de etanol e uma possível prevenção deste efeito pela luteína.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. MEMÓRIA

A memória é caracterizada pela capacidade de armazenar e recordar aprendizados anteriores, sendo o aprendizado a aquisição de novas informações e fatos obtidos através de experiências ouvidas ou vividas (IZQUIERDO, 2002).

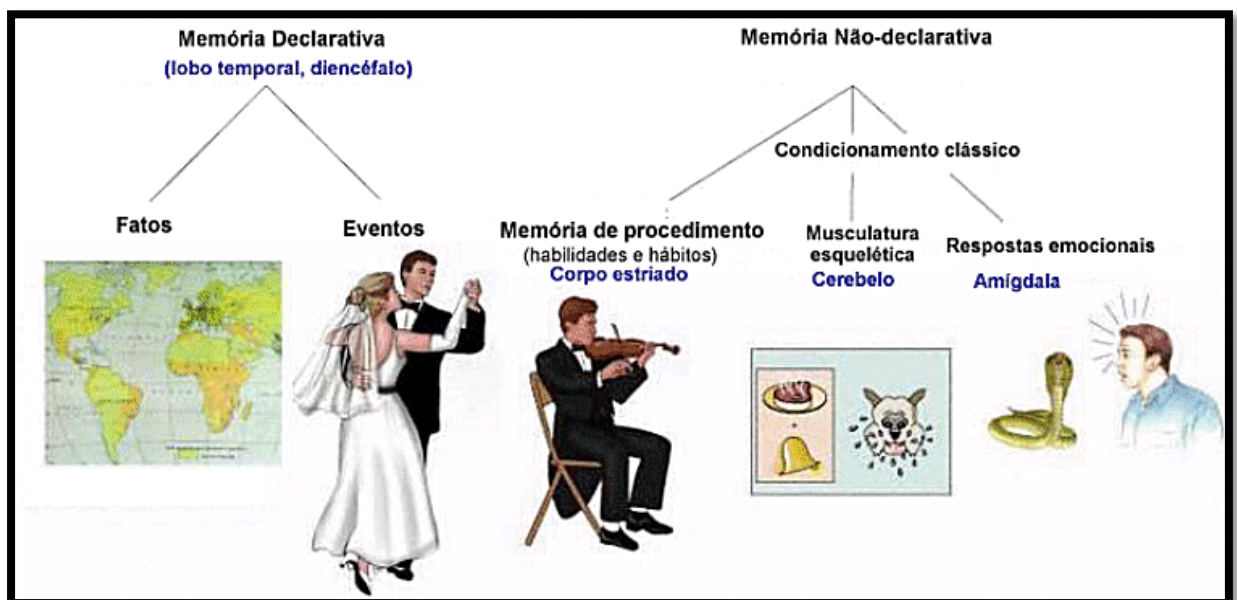
A formação de uma nova memória depende de três fases: a aquisição, quando uma informação é adquirida, seguida pela consolidação, armazenamento da informação, e por fim, a evocação, quando a memória está pronta para ser lembrada (ABEL; LATTAL, 2001).

A memória pode ser classificada de diferentes formas, principalmente, quanto ao tempo de duração e ao conteúdo. Quanto ao tempo de duração existe a memória imediata, de curta e de longa duração. A memória imediata, também chamada memória de trabalho, mantém as informações por apenas alguns segundos, não deixando traços ou produzindo arquivos, como por exemplo, a capacidade de repetir corretamente seis ou sete dígitos (KAUSHALL; ZETIN; SQUIRE, 1981). A memória de curta duração é mantida por minutos ou poucas horas, enquanto a memória de longa duração é armazenada por um período maior, permanecendo por meses, anos ou até pela vida inteira. As memórias de longa duração não são processadas instantaneamente, necessitando serem consolidadas ao longo do tempo após o aprendizado (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2000; MCGAUGH, 2000; IZQUIERDO, 2002; SQUIRE; KANDEL, 2003; RANGANATH; BLUMENFELD, 2005).

Além disso, de acordo com o conteúdo, existem dois diferentes tipos de memória: declarativa e não declarativa (Figura 1). A memória declarativa, também chamada de memória explícita, é evocada de maneira consciente, podendo ser verbalizada. Esta memória pode ser subdividida em duas categorias: episódica, memória para acontecimentos que ocorreram em nossa vida, como uma viagem ou uma festa; e semântica, memória para o conhecimento geral, não ligada a um evento específico, mas sim ligada a conhecimentos de palavras e seu uso, objetos, conceitos e fatos (DALLA BARBA et al., 1998), como por exemplo o conhecimento sobre o mundo (TULVING, 1983). A memória não declarativa ou implícita é evocada

de maneira inconsciente, não podendo ser verbalizada. Nesta categoria está incluída a memória de procedimento, relacionada com hábitos, habilidades motoras e comportamentos, como andar de bicicleta ou dirigir um automóvel (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1988; SQUIRE; KNOWLTON; MUSEN, 1993; SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996; STICKGOLD, 2005).

Em geral, a memória declarativa é frequentemente formada, necessitando poucas exposições ao aprendizado, mas instável, podendo ser esquecida, enquanto, a formação da memória não declarativa requer repetição e prática durante um período mais longo, mas costuma ser mais duradoura (PEIGNEUX et al., 2001; WIXTED, 2004).



**Figura 1 - Classificação da memória.**

**Fonte:** Bear, Connors e Paradiso (2002).

### 3.1.1. Hipocampo e córtex

O córtex cerebral e o hipocampo são estruturas de grande importância para os processos de aprendizado e formação da memória (SCOVILLE; MILNER, 1957; BREWER et al., 1998; WAGNER et al., 1998; BOHBOT; ALLEN; NADEL, 2000; YONELINAS, 2002). O córtex cerebral (palavra derivada do latim: córtex = casca) é a camada mais externa do cérebro dos vertebrados e pode ser dividido em quatro áreas chamadas de lobos cerebrais, possuindo cada uma, funções diferenciadas e especializadas. O lobo frontal está localizado na porção anterior do cérebro; o lobo

occipital, na porção posterior; o lobo parietal, na parte superior central; e os lobos temporais, nas regiões laterais do cérebro (ALLMAN, 2000; AL-CHALABI; TURNER; DELAMONT, 2006; MARTIN; KESSLER, 2015).

Na região do lobo temporal estão localizadas estruturas como córtex parahipocampal, córtex perirrinal e córtex entorrinal, além do hipocampo (Figura 2a) (EICHENBAUM, YONELINAS; RANGANATH, 2007). O hipocampo, nome derivado do formato curvado semelhante a um cavalo-marinho (do grego: hippos = cavalo, kampi = curva), é formado por duas camadas de neurônios, dobradas uma sobre a outra, sendo uma chamada de giro denteado e a outra de corno de Amon, esta última apresentando três divisões: CA1, CA2 e CA3 (MILLER; O'CALLAGHAN, 2005). O córtex entorrinal e o hipocampo são estruturas interconectadas, sendo que a grande via de entrada de informações no hipocampo é o córtex entorrinal, que envia as informações por meio de um feixe de axônios, chamado via perforante. Estes axônios estabelecem sinapses em neurônios do giro denteado e posteriormente no corno de Amon, como mostra a Figura 2b (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002; WATTS; THOMSON, 2005; BURKE; BARNES, 2010). Sendo que o córtex entorrinal recebe fibras de vias sensoriais, de praticamente todo o córtex cerebral (THINUS-BLANC, 1996; AMARAL; SCHARFMAN; LAVENEX, 2007; EICHENBAUM, YONELINAS; RANGANATH, 2007).

De fato, o hipocampo possui grande importância para a formação da memória, uma vez que manipulações farmacológicas e bioquímicas nestas áreas alteram a memória em diferentes tarefas (MORRIS, 1989; IZQUIERDO; MEDINA, 1995; BERNABEU et al., 1996; AGGLETON et al., 2000; RUBIN et al., 2000; BERLESE et al., 2005; GUERRA et al., 2006; BONINI et al., 2011; KORNISIUK et al., 2011, GUERRA et al., 2011; 2012). Além disso, evidências mostram que ratos com lesões no hipocampo apresentam um prejuízo no aprendizado espacial (BROADBENT; SQUIRE; CLARK, 2004; GOODRICH-HUNSAKER et al., 2010; GOODRICH-HUNSAKER; HOPKINS, 2010).

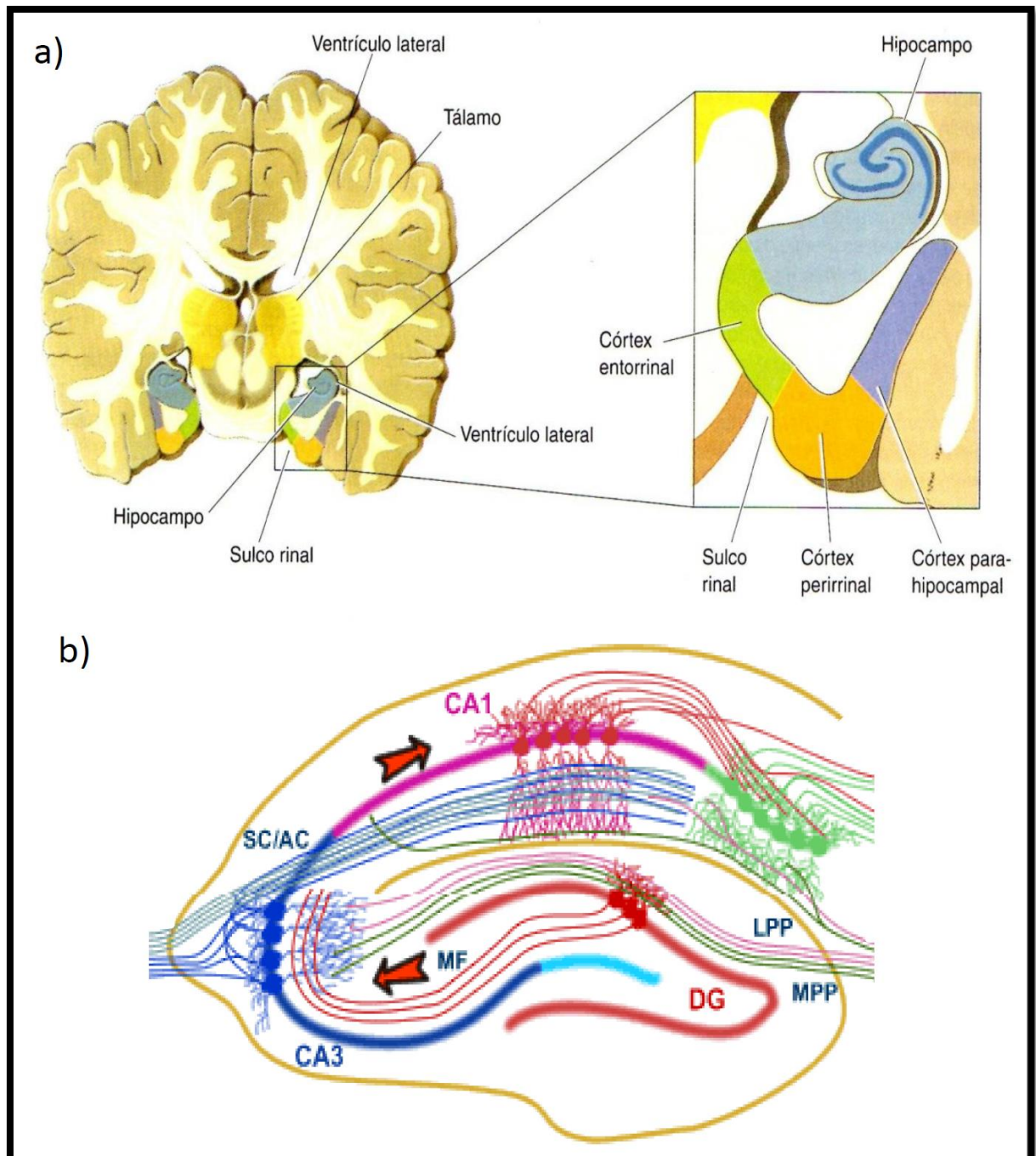


Figura 2 - Estruturas do lobo temporal (hipocampo e córtex) envolvidas na formação da memória: a) O cérebro seccionado coronalmente para mostrar o hipocampo e o córtex no lobo temporal. b) Representação esquemática do hipocampo e seus microcircuitos. CA: corno de Amon; DG: giro denteado.

Fonte: Adaptado de Bear, Connors e Paradis (2002).

Fonte: Adaptado de University of Bristol, Centre for Synaptic Plasticity. Disponível em: <[www.bristol.ac.uk/synaptic/pathways/](http://www.bristol.ac.uk/synaptic/pathways/)>.

### 3.2. ETANOL

A intoxicação e a dependência pelo álcool é um dos maiores problemas de saúde pública. O álcool é uma das drogas mais utilizadas no mundo (SHER, 2006), sendo que, em 2014 nos Estados Unidos, 87,6 % das pessoas relatam consumo de álcool em algum momento de suas vidas e cerca de 16,3 milhões de adultos apresentaram algum transtorno decorrente deste uso (SAMHSA, 2014). Tanto a dependência, como o consumo excessivo do álcool podem favorecer uma ampla gama de problemas médicos, psicológicos, sociais, pessoais e econômicos (GRANT et al., 2004; REHM et al., 2009), tornando-se a quarta causa de morte nos Estados Unidos (STAHRE et al., 2014). Por exemplo, estas desordens relacionadas ao álcool afetam 18 milhões de americanos, com 79.000 mortes a cada ano (BOUCHERY et al., 2011) e um custo superior de 220 bilhões de dólares por ano à economia do país com cuidados médicos e/ou perda de produtividade (HASIN et al., 2007; BOUCHERY et al., 2011).

O etanol é uma substância psicoativa depressora do sistema nervoso central (CROCE; CROCE JÚNIOR, 2012) e a maior parte ingerida é metabolizado no fígado pela enzima ADH citosólica para acetaldeído, que é oxidado pela ALDH mitocondrial em acetato (LIEBER, 2004). O etanol também pode ser metabolizado pelo citocromo P450, isoforma CYP2E1 (induzido durante o abuso crônico do álcool) e pela CAT peroximal em acetaldeído em ambos o fígado e pulmão (BERNSTEIN; BASILIO; MARTINEZ, 1990; RIKANS; GONZALEZ, 1990; YIN et al., 1992; JONES, 1995).

Existem diferentes formas de quantificar o consumo excessivo de álcool, desde o volume ingerido, que varia de cinco bebidas alcoólicas em uma única ocasião para homens e quatro para as mulheres, em cerca de 2 horas, até a concentração de álcool no sangue. Parâmetro definido, como qualquer momento em que se atinge um pico de álcool no sangue de 0,08% (NIAAA, 2004).

Existem diferentes formas de exposição ao etanol, como a forma aguda, que refere-se a uma sobredosagem única (BENNETT; CHEREK; SPIGA, 1993; SCHMIDT; DALHOFF; POULSEN, 2002; INEU et al., 2008; 2013; REYNOLDS, RICHARDS, WIT, 2006; ZOETHOUT et al., 2011), sub-crônica, caracterizada pela exposição repetida por um período de aproximadamente 7 dias (SCHMIDT; DALHOFF; POULSEN, 2002) ou crônica, exposições contínuas por longos períodos (BENNETT; CHEREK; SPIGA, 1993; SCHMIDT; DALHOFF; POULSEN, 2002).

A maioria das pessoas consome álcool para atenuar os estados emocionais negativos, como ansiedade, tensão e estresse e aumentar os positivos como relaxamento e euforia (COOPER et al., 1995; KASSEL; JACKSON; UNROD, 2000; KASSEL et al., 2007).

Os efeitos da intoxicação alcoólica se manifestam de acordo com os níveis sanguíneos, uma concentração de 0,1 a 0,3 g/L provoca leve euforia, relaxamento e alteração das funções visuais e motoras, concentrações de 0,4 a 0,6 g/L provocam taquicardia e diminuição de funções cerebrais, em 0,6 a 1 g/L ocorre depressão, problemas de coordenação e força muscular, quando atinge uma concentração igual ou superior a 4 g/L, ocorrem dificuldades respiratórias e até a morte (GLOBAL ROAD SAFETY PARTNERSHIP, 2007).

O consumo inicial de álcool é fortemente influenciado por fatores sociais (KÖHNKE, 2008), sendo que a utilização leve ou moderada pode até proporcionar efeitos benéficos (WANNAMETHEE et al., 2002; MUKAMAL et al., 2003; 2005; PATRA et al., 2010), entretanto, o abuso, o qual algumas evidências demonstram estar associado a fatores genéticos (BUSCEMI; TURCHI, 2011; KIMURA; HIGUCHI, 2011; PAN et al., 2013), pode afetar diversos sistemas do corpo, ocasionando uma variedade de comorbidades (HEFFERNAN, 2008; ZORUMSKI; MENNERICK; IZUMI, 2014). Entre os principais problemas, está o aumento do risco de doenças hepáticas (MCCULLOUGH; O'SHEA; DASARATHY, 2011), distúrbios neuropsiquiátricos (RIVAS et al., 2013), doenças cardiovasculares, doenças digestivas e também o câncer (CORRAO et al., 2000).

Embora os efeitos ocorram, praticamente, em todos os tecidos e órgãos do corpo, o cérebro é considerado um dos principais alvos do excesso de álcool no organismo, podendo sofrer alterações estruturais, funcionais (HARPER; MATSUMOTO, 2005; PFEFFERBAUM et al., 2010) e, em alguns casos, neurodegeneração (CREWS et al., 2004; CREWS; NIXON, 2009; PASCUAL et al., 2011), alterando a atividade de canais iônicos, receptores e enzimas, contribuindo para redução da função e plasticidade sináptica (HARRIS, 1999; VENGELIENE et al., 2008; ZORUMSKI; MENNERICK; IZUMI, 2014).

Nesse sentido, a administração de etanol em diferentes doses (2-15 g/kg) aumenta a morte neuronal em regiões específicas do cérebro, como hipocampo e córtex entorrinal (ZOU et al., 1996; COLLINS; CORSO; NEAFSEY, 1996; OBERNIER; BOULDIN; CREWS, 2002; CIPPITIELI et al., 2010a; 2010b; BADSHAH

et al., 2014). A morte neuronal após administração de etanol pode ser determinada pela ativação da cascata de caspase 3 e 9 (DAS; MUKHERJEE; VASUDEVAN, 2011; ULLAH et al., 2011; BADSHAH et al., 2014), proteases de cisteína, consideradas as principais causadoras da apoptose (RUPINDER; GURPREET; MANJEET, 2007).

### 3.2.1. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição biológica caracterizada por um aumento na produção de espécies reativas e a incapacidade dos tecidos de neutralizá-las através do sistema de defesa antioxidante, causando um desequilíbrio entre produção e remoção (NIZUMA et al., 2010). O aumento da produção destas espécies reativas resulta em um dano oxidativo de biomoléculas, como lipídios de membranas, proteínas e DNA (ZHONG et al., 2009).

As espécies reativas são átomos, moléculas ou íons que possuem alta reatividade devido a sua instabilidade, podendo ser classificadas, principalmente, em EROs e espécies reativas de nitrogênio (CHEESEMAN; SLATER, 1993). As espécies reativas, derivadas do oxigênio ou nitrogênio, incluem as espécies radicalares (radicais livres) e as não radicalares (FINKEL; HOLBROOK, 2000; VISIOLI; KEANEY; HALLIWELL, 2000). Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no orbital externo, favorecendo transferência de elétrons com moléculas vizinhas, promovendo uma alta reatividade. Alguns exemplos são:  $O_2^-$ ,  $OH^*$ ,  $NO^*$ ,  $ROO^*$  e  $O_2$  (KOPPENOL, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; STEINBRENNER; SIES, 2009). Os compostos não radicalares,  $H_2O_2$ ,  $HOCl$ ,  $O_3$  e  $^1O_2$ , não possuem elétrons livres, sendo menos instáveis que os radicais livres (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001; HALLIWELL, 2001; STEINBRENNER; SIES, 2009).

As EROs são naturalmente produzidas pelo metabolismo dos seres vivos, sendo as mitocôndrias a maior fonte endógena. A formação ocorre, principalmente, na cadeia respiratória, quando durante o transporte de elétrons são geradas formas parcialmente reduzidas de  $O_2$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; FISKUM et al., 2004; STEINBRENNER; SIES, 2009). É estimado que cerca de 2-3% do oxigênio consumido na cadeia respiratória seja convertido em EROs. O  $O_2^-$  é o mais comumente gerado, a partir de elétrons que escapam da cadeia transportadora nas

mitocôndrias e reduzem o O<sub>2</sub> presente nas células, podendo posteriormente originar outras espécies reativas (HALLIWELL; ARUOMA, 1993; O'NEILL; FIELDEN, 1993; WILLIAMS et al., 2004). Fatores externos, como a radiação UV, tabagismo, poluentes, drogas, dietas excessivamente calóricas, álcool, pesticidas, podem induzir a formação de espécies reativas (BAGCHI; PURI, 1998; EBADI, 2001; STEINBRENNER; SIES, 2009; WU; CEDERBAUM, 2009; GUTIERRES et al., 2012).

A produção fisiológica de EROs é um processo indispensável, com importantes funções biológicas, atuando, por exemplo, como mensageiros de sinalização ou no combate de corpos estranhos durante processos inflamatórios, entretanto, a produção excessiva causadora dos danos oxidativos, deve ser prevenida ou neutralizada pelo organismo (POLI et al., 2004). A produção excessiva de EROs está ligada ao surgimento de algumas doenças, como cardiovasculares e o câncer, além de causar a morte celular e anormalidades morfológicas no cérebro, que podem provocar várias doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (MARLIN et al., 2002; RAO; BHARANI; PALLAVI, 2006; TRUSHINA; MCMURRAY, 2007; REDDY, 2008).

Entretanto, existe o sistema antioxidante, um mecanismo de defesa, que pode ser do tipo enzimático ou não enzimático (DURAK et al., 2010). Os antioxidantes não enzimáticos, que incluem compostos sintetizados pelo organismo, como bilirrubina, ceruloplasmina, ácido úrico e elementos obtidos da dieta, como tocoferol, vitamina E e C, e também o NPSH, tem a capacidade de sequestrar elétrons não emparelhados dos radicais livres, prevenindo o estresse oxidativo (MCCALL; FREI, 1999; GILGUNSHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001; DURAK et al., 2010). Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas SOD, CAT e GPx (DURAK et al., 2010). Os antioxidantes neutralizam as EROS e outros tipos de radicais livres, possuindo um papel importante na defesa contra o estresse oxidativo (PUNEET et al., 2007).

Entre os muitos fatores que podem induzir ao estresse oxidativo, a exposição aguda ou crônica de etanol é descrita aumentar a produção de espécies reativas e diminuir as defesas antioxidantes (CALABRESE et al., 2000; INEU et al., 2008; 2013; WU; CEDERBAUM, 2003).

Um aumento na produção de EROs e consequente estresse oxidativo induzido pelo álcool envolve, principalmente, alterações na proporção do NAD<sup>+</sup>/NADH nas células, pois a enzima ADH converte o etanol em acetaldeído, que é tóxico e reativo para a molécula, o ALDH converte o acetaldeído em acetato e



assim, cada uma dessas reações conduz a formação de uma molécula de NADH, provocando a intensa atividade da cadeia respiratória (WU; CEDERBAUM, 2009). Além disso, o álcool induz o citocromo P450 (isoforma CYP2E1) (HAORAH et al., 2008), gerando o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio (KESSOVA; CEDERBAUM, 2003).

Assim sendo, o etanol conduz a formação das espécies reativas em diferentes áreas do cérebro, causando danos em células e alterações em macromoléculas, como proteínas, DNA e membranas lipídicas (HALLIWELL, 2006; NAZIROGLU, 2009). Neste sentido, evidências demonstram que a inalação de etanol (1,6 g/kg) por 12 semanas (DAS; MUKHERJEE, 2010) ou administração aguda (70%, 2 mL/kg) por via oral (IBRAHIM et al., 2012), aumentam a peroxidação lipídica. A administração intragástrica de etanol (13 g/kg), por 45 dias, também resulta em estresse oxidativo detectado pelo acúmulo hepático de MDA e 4-hidroxinonenal (RONIS et al., 2005).

Somando-se a isso, o álcool também reduz os níveis dos antioxidantes, que podem eliminar as EROs (SERGENT et al., 2001). Assim, seguindo uma intoxicação por etanol, o equilíbrio entre os antioxidantes e os prooxidantes encontra-se perturbado, resultando no dano celular (SERGENT et al., 2001). Neste sentido, a inalação de etanol (1,6 g/kg) por 12 semanas (DAS; MUKHERJEE, 2010) ou administração aguda (70%, 2 mL/kg) por via oral (IBRAHIM et al., 2012), induzem significativa diminuição de enzimas antioxidantes como, SOD, CAT e GPx.

Além disso, tem sido demonstrado que o abuso no consumo de álcool induz a processos neuroinflamatórios, um mecanismo que culmina em progressivo dano neuronal (CHOI; AID; BOSETTI, 2009; JACOBS; TAVITIAN, 2012). O consumo de álcool é capaz de rapidamente aumentar a atividade do NF- $\kappa$ B (BENJAMINS et al., 2011), provocando uma produção excessiva de mediadores inflamatórios no cérebro, como, COX-2, iNOS e citocinas interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6 (VALLÉS et al., 2004; BLANCO et al., 2005; ZHAO et al., 2013; YANG et al., 2014). Estes processos inflamatórios podem provocar uma possível neurodegeneração (BLANCO; GUERRI, 2007), desencadeada pela liberação de citocinas e EROs (VALLÉS et al., 2004; QIN et al., 2008; ZOU; CREWS, 2010).

### **3.2.2. Déficit de memória induzido por etanol**

Entre as várias consequências que podem ocorrer devido a exposição excessiva ao etanol e prováveis alterações no cérebro estão os déficits cognitivos, de aprendizagem e de memória de curto ou longo prazo (SIRCAR; SIRCAR, 2005; PASCUAL et al., 2007), podendo, em alguns casos, ocorrer a "demência alcoólica" caracterizada pela deficiência persistente na memória (OSLIN et al., 1998; OSLIN; CARY, 2003). Modificações neuropatológicas e comportamentais observados em humanos com excessiva exposição ao álcool têm sido utilizadas em modelos animais (OBERNIER et al., 2002; MITRIRATTANAKUL et al., 2007; FAINGOLD, 2008; STEPHENS; DUKA, 2008). De fato, evidências demonstram que lesões cerebrais e déficit de memória estão relacionados com a exposição ao álcool em humanos (JARVENPAA et al., 2005; SULLIVAN; PFEFFERBAUM, 2005; BERESFORD et al., 2006) ou animais (PASCUAL et al., 2007; CACACE et al., 2011; ROBINSON et al., 2012).

Os déficits de aprendizado e memória podem ocorrer a partir de diferentes formas de exposição ao etanol, como aguda (RYABININ; MILLER; DURRANT, 2002; NOVIER et al., 2013), sub-crônica (CIPPITELLI et al., 2010a; 2010b; KUZMIN et al., 2012) ou crônica (FARR et al., 2005; GARCÍA-MORENO; CIMADEVILLA, 2012). Neste sentido, a administração intraperitoneal de etanol (1,5-2,5 g/kg) diariamente antes do treino (WRIGHT et al., 2003) ou em dosagem única (ACHESON; ROSS; SWARTZWELDER, 2001) prejudica a aquisição da memória espacial em ratos. Além disso, a administração intragástrica de etanol (2-15 g/kg) durante 4 (OBERNIER et al., 2002; CIPPITIELI et al., 2010b), 6 (KUZMIN et al., 2012) ou 7 dias (GOMEZ et al., 2013) causam significativos déficits de aprendizado e memória.

Contudo, existem estudos que evidenciam os efeitos dos antioxidantes durante a neurotoxicidade induzida pelo álcool (RAGHAVENDRA; KULKARNI, 2001; SPONG et al., 2001; SILER-MARSIGLIO, SHAW; HEATON, 2004).

Nos últimos anos, ocorreu um aumento na prevalência do consumo de álcool, e muitas pessoas normalmente consomem de forma aguda (em dose elevada), sub-crônica ou crônica, podendo apresentar prejuízo de aprendizado e memória. Portanto, evitar disfunções que prejudiquem atividades cotidianas, assim como, a produtividade no trabalho ou nos estudos, torna-se importante.

Assim, estudos que contribuam para o desenvolvimento de tratamentos e novas opções terapêuticas capazes de evitar, reduzir ou eliminar déficits de memória induzidos por etanol, sendo eficazes, seguros, com baixo custo e que não

apresentem efeitos colaterais, são de grande relevância para a sociedade.

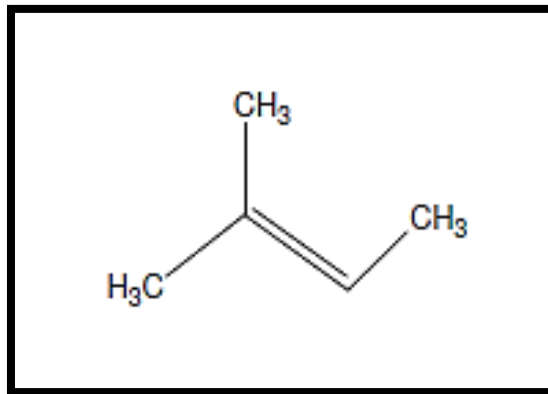
### **3.3. CAROTENOIDES**

Evidências crescentes apontam para o importante papel dos compostos bioativos, constituintes extranutricionais presentes, principalmente, nos alimentos de origem vegetal, que atuam na manutenção da saúde e na redução do risco de doenças, sem o surgimento de efeitos colaterais como no caso de algumas drogas farmacêuticas (ESPÍN et al., 2007; KUSSMANN et al., 2007; REIN et al., 2013). Estudos demonstram que compostos bioativos encontrados nos alimentos, como vitaminas B, C, D e E, flavonoides, ácidos graxos polinsaturados, curcumina, piperina, entre outros, estão sendo avaliados como alternativa para o tratamento de diversas doenças, dentre elas, o câncer, cardiovasculares, neurodegenerativas (JOSEPH et al., 2009; KAUR, CHAUHAN; SANDHIR, 2011; OBULESU; DOWLATHABAD; BRAMHACHARI, 2011; GILLETTE-GUYONNET; SECHER; VELLAS, 2013; MI et al., 2013; GUTIERRES et al., 2012; 2014).

Neste sentido, os carotenoides demonstram efeitos benéficos para saúde humana, com a redução do risco de doenças, como as gastrointestinais, cardiovasculares, obesidade, diabetes e câncer (GIOVANNUCCI, 2002; RAO; RAO, 2007; GALLICCHIO et al., 2008). Muitas dessas doenças podem ser prevenidas devido as propriedades antioxidantes dos carotenoides, que permite o combate aos radicais livres, como EROS, desenvolvendo, portanto, um importante papel na proteção das células contra os danos oxidativos (YOUNG; LOWE, 2001; GAO et al., 2011).

Os carotenoides, moléculas lipofílicas, solúveis principalmente em solventes não polares, são sintetizados por organismos fotossintéticos, incluindo plantas, algas, ciano bactérias e algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos, estando amplamente distribuídos na natureza (SIES; STAHL, 2003).

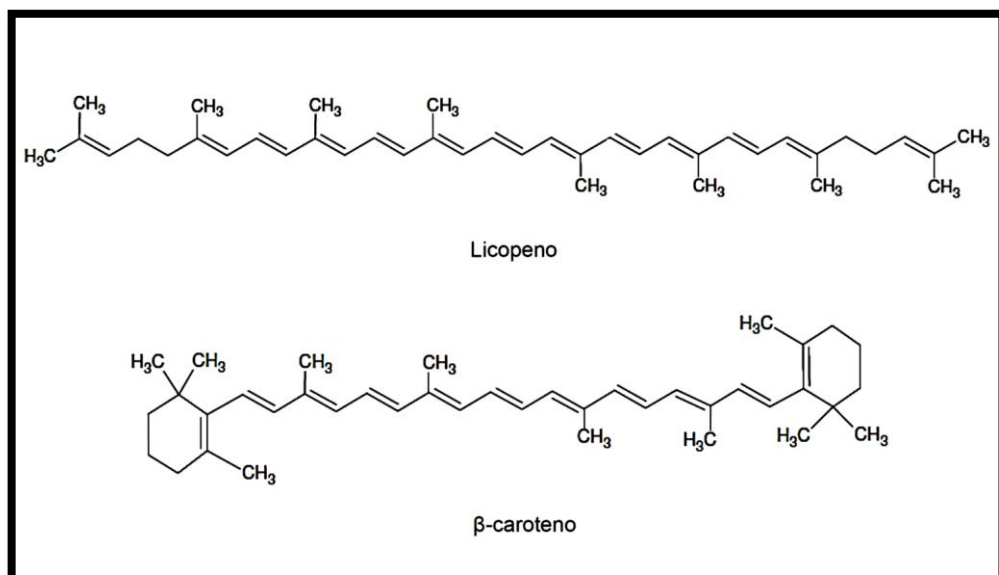
Os carotenoides são tetraterpenos, formados por 40 átomos de carbono em 8 unidades de isopreno, cuja ordem isoprenoide é invertida no centro da molécula (BHOSALE; BERNSTEIN, 2005) (Figura 3).



**Figura 3 - Estrutura química do isopreno.**

**Fonte: Software ChemSketch**

Existem, aproximadamente, 700 carotenoides divididos em dois grandes grupos: os carotenos, como o  $\beta$ -caroteno e licopeno (Figura 4), que consistem em hidrocarbonetos puros, e as xantofilas, hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados, como luteína e zeaxantina. De todos os carotenoides, apenas 40 podem ser encontrados nos alimentos, sendo responsáveis pela coloração vermelha, amarela e laranja das frutas e vegetais (SIES; STAHL, 2003).



**Figura 4 - Estrutura química dos carotenoides licopeno e  $\beta$ -caroteno.**

**Fonte: Software ChemSketch**

Os carotenoides não podem ser sintetizados pelos humanos, sendo obtidos através do consumo de certas frutas e vegetais (CALVO, 2005). Após a ingestão estas substâncias são absorvidas no intestino por difusão passiva depois de serem

incorporados às micelas de ácidos graxos dietéticos e bile. Em seguida, são incorporados aos quilomicrons, liberados para o sistema linfático e incorporados às lipoproteínas no fígado, que serão liberadas na corrente sanguínea (PARKER, 1988; ERDMAN, BIERER; GUGGER, 1993; PARKER, 1996). Assim, o transporte dos carotenoides ocorre em conjunto com as lipoproteínas (THURNHAM et al., 2000), sendo o principal local de armazenamento o tecido adiposo (PARKER, 1988; ERDMAN, BIERER; GUGGER, 1993; PARKER, 1996). Os carotenos são encontrados principalmente nas LDL, enquanto as xantofilas, possuindo um ou mais grupos funcionais polares, são mais uniformemente distribuídas entre as HDL e a LDL (CLEVIDENCE; BIERI, 1993; YEUM; RUSSELL, 2002).

Os seis carotenoides presentes em maior quantidade no plasma sanguíneo, representando aproximadamente 90%, são  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina e criptoxantina (FAULKS; SOUTHON, 1997; ZHAO et al., 2006). No cérebro, as xantofilas, como a luteína, zeaxantina e criptoxantina, são responsáveis por 72% do total dos carotenoides, sendo que destes, a luteína representa 34%, quantidade significativamente maior do que todos os outros carotenoides (JOHNSON et al., 2013). Além disso, apenas luteína e seu isômero, zeaxantina, carotenoides oxigenados, estão acumulados na mácula, região central da retina, sendo, portanto, estes carotenoides também chamados pigmentos maculares (BONE, LANDRUM; TARSIS, 1985; AHMED; LOTT; MARCUS, 2005).

### **3.3.1. Luteína**

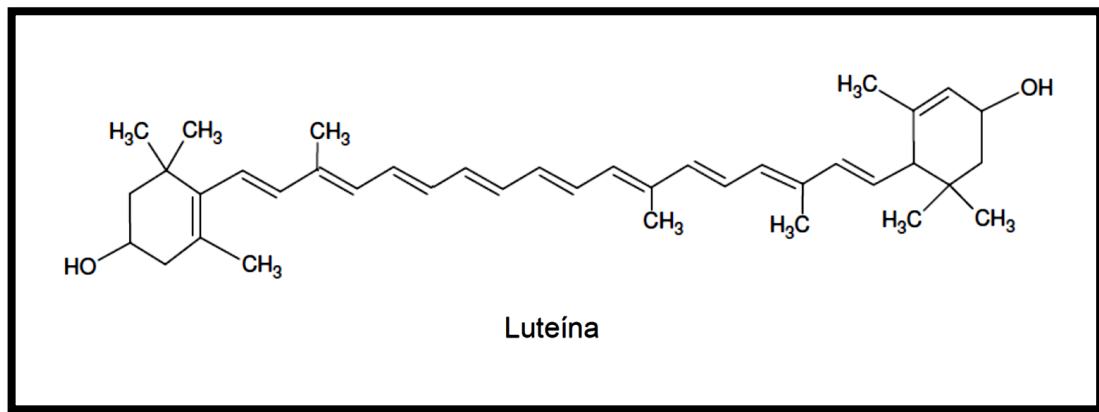
#### **3.3.1.1. Estrutura química e metabolismo**

A luteína, um membro das xantofilas, é abundantemente encontrada nas flores de calêndula, gema de ovo e vegetais de folhas verde-escuras (KRINSKY; LANDRUM; BONE, 2003; CHRISTEN et al., 2008).

O conteúdo da luteína nos vegetais é caracterizada por um amplo intervalo, a partir de 0,012-0,016 mg/100 g de cebola, rabanete e couve-flor, 12-18 mg/100 g de espinafre, salsa verde, milho e até 39 mg/100 g em algumas variedades de couve

(HART; SCOTT, 1995; HOLDEN et al., 1999; MANGELS et al., 1993; MURKOVIC et al., 2000; MÜLLER, 1996; O'NEILL et al., 2001). Além disso, nos ovos varia de 0,27 a 1,07 mg/100 g de alimento (HAMULKA; KOCZARA; GRONEK, 2005).

A luteína, um hidroxicarotenoide com fórmula molecular  $C_{40}H_{56}O_2$ , possui estrutura formada por uma longa cadeia de carbonos com ligações duplas conjugadas, grupos metil nas laterais e uma estrutura cíclica (hexenil) ligada a um grupo hidroxila em ambas as extremidades da cadeia, como mostra a Figura 5 (CALVO, 2005). Diferentemente de outros carotenoides, os dois grupos hidroxilas em cada molécula podem controlar as funções biológicas dessa xantofila (JOHNSON, 2002).



**Figura 5 - Estrutura química da luteína.**

**Fonte: Software ChemSketch**

A sua absorção e metabolismo é similar a rota de outros compostos lipofílicos (KRINSKY; LANDRUM; BONE, 2003).

A luteína é normalmente encontrada na forma esterificada podendo também existir na forma livre (LAI et al., 1996). A luteína livre está localizada na superfície dos lipossomas formados no processo digestivo. Por outro lado, a luteína esterificada contém ácidos graxos, principalmente o palmitato, esterificado pelos grupos hidroxila e são mais susceptíveis em estar no núcleo do lipossoma, por serem moléculas hidrofóbicas. Além disso, a luteína esterificada deve ser hidrolisada à luteína livre, por hidrolases inespecíficas que estão tanto no lúmen intestinal como no enterócito, pois a luteína livre é a principal forma presente na circulação após digestão (FURR; CLARK, 1997).

Desta forma, antes de ser captada pelos enterócitos, os ésteres de luteína são hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais, como a colesterol esterase (HOF et al., 2000) e depois que a luteína é absorvida pelos enterócitos, a mesma é transportada através do lúmen intestinal e incorporada aos quilomicrons. Através da circulação sanguínea os quilomicrons são levados aos hepatócitos, onde são incorporados às lipoproteínas e, por fim, liberados para a circulação sistêmica (YEUM; RUSSELL, 2002; KRINSKY; LANDRUM; BONE, 2003). Assim, a luteína é transportada no soro pelas lipoproteínas em circulação, igualmente distribuída entre a LDL e a HDL (ERDMAN; BIERER; GUGGER, 1993; ROMANCHIK; MOREL; HARRISON, 1995; GOULINET; CHAPMAN, 1997; YEUM; RUSSELL, 2002; COMBS, 2012) e localizada na superfície externa das lipoproteínas (YEUM; RUSSELL, 2002).

### **3.3.1.2. Efeitos protetores e mecanismos de ação**

A luteína apresenta propriedades antioxidantes, removendo radicais livres e conseqüentemente, impedindo o dano as lipoproteínas, lipídios de membrana, proteínas e DNA, evitando assim o estresse oxidativo (TREVITHICK et al., 2005; WANG et al., 2006; KIM et al., 2008; OZAWA et al., 2012; WANG et al., 2013).

A ação antioxidante da luteína está associada a sua estrutura química, principalmente devido à presença de grupos hidroxila nas extremidades da cadeia, tornando esta xantofila mais hidrofílica em relação aos carotenoides não oxigenados, e permitindo uma orientação perpendicular à membrana lipídica. Isto de fato melhora o contato com os lipídios de membrana celular altamente oxidáveis e aumenta a eficácia na habilidade de proteger a matriz lipídica contra o dano oxidativo (SUBCZYNSKI; WISNIEWSKA; WIDOMSKA, 2010). Sendo, portanto, a luteína, considerada um antioxidante mais potente em relação a outros carotenoides (WANG et al., 2006; LI; LO, 2010; SUBCZYNSKI; WISNIEWSKA; WIDOMSKA, 2010).

Além disso, a luteína exerce papel protetor contra a inflamação e apoptose, reduzindo a atividade do NF-kB, a expressão da COX-2 e outros mediadores inflamatórios como, as citocinas interleucina-1 $\beta$  e interleucina-6 (KRISHNASWAMY; DEVARAJ; PADMA, 2010; GAO et al., 2012; LI et al., 2012). Desta forma, pode atenuar a resposta inflamatória, sendo eficaz em diminuir o risco no

desenvolvimento de doenças relacionadas com o estresse oxidativo e inflamação (WANG et al., 2013).

Neste sentido, baixos níveis de luteína no plasma e aumento do nível de MDA são relacionados com os níveis aumentados de estresse oxidativo, encontrados em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico (POLIDORI et al., 2002). Algumas evidências demonstram que a suplementação ou uma dieta rica em luteína previne a neurodegeneração macular induzida pela diabetes (MURIACH et al., 2006; SASAKI et al., 2010) ou relacionada a idade (KRINSKY; LANDRUM; BONE, 2003), protege a pele contra os efeitos oxidantes nocivos da exposição UV (LEE et al., 2004), reduz o risco de alguns tipos de câncer (SLATTERY et al., 2000; SUMANTRAN et al., 2000), diminui a progressão da aterosclerose prematura (DWYER et al., 2001) e inibe a apoptose em um modelo experimental de isquemia da retina (LI et al., 2009).

### **3.4. LUTEINA E MEMÓRIA**

Algumas linhas de evidências demonstram que a luteína é um dos carotenoides envolvidos nos processos de aprendizado, memória e doenças neurodegenerativas. Primeiro, a suplementação ou o consumo de uma dieta rica em fontes de luteína estão associadas às baixas taxas de declínio cognitivo decorrentes do envelhecimento (KANG; ASCHERIO; GRODSTEIN, 2005; JOHNSON et al., 2008; JOHNSON, 2012; KESSE-GUYOT et al., 2014). Neste sentido, a administração oral de luteína (50 ou 100 mg/kg) é descrita melhorar os déficits cognitivos causados pela doença de Huntington (BINAWADE; JAGTAP, 2013).

Segundo, a luteína é o principal carotenoide encontrado no cérebro humano, com cerca de 30% da concentração total de carotenoides, além de apresentar capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, com captação preferencial sobre a maioria dos outros carotenoides e correlação positiva entre os níveis do soro e do cérebro (CRAFT et al., 2004; JOHNSON et al., 2013; VISHWANATHAN et al., 2014a). Sendo recentemente relatado, como o carotenoide predominante no cérebro em desenvolvimento de crianças (VISHWANATHAN et al., 2014b). Além disso, é demonstrado que o acúmulo de luteína na região macular está associado com os



níveis presentes em regiões do cérebro, como cerebelo, córtex frontal e occipital (VISHWANATHAN et al., 2013; 2014a).

Terceiro, uma melhora na função cognitiva está associada com níveis aumentados de luteína no soro e no cérebro (JOHNSON et al., 2013). Um estudo ainda demonstra que o aumento da densidade óptica do pigmento macular é positivamente correlacionado com as medidas de função cognitiva (VISHWANATHAN et al., 2013)

Quarto, indivíduos com déficit cognitivo leve (RINALDI et al., 2003; AKBARALY et al., 2007; JOHNSON et al., 2013) ou Doença de Alzheimer (RINALDI et al., 2003; WANG et al., 2008; KIKO et al., 2012; DIAS et al., 2014) possuem níveis de luteína reduzidos no plasma e no cérebro quando comparados a indivíduos normais. Além disso, a baixa densidade óptica do pigmento macular está associada a um menor desempenho cognitivo em idosos (FEENEY et al., 2013).

Desta forma, considerando os resultados confluentes que suportam o papel da luteína na função cognitiva e prevenção de doenças degenerativas, é possível afirmar que este carotenoide desempenha um importante papel na neuroproteção e demais funções neuronais (RINALDI et al., 2003; KANG; ASCHERIO; GRODSTEIN, 2005; AKBARALY et al., 2007; JOHNSON et al., 2008; JOHNSON, 2012; KIKO et al., 2012; JOHNSON et al., 2013; DIAS et al., 2014; KESSE-GUYOT et al., 2014; MULDER et al., 2014). Este efeito protetor da luteína parece estar relacionado com a função antioxidante, comum para grande parte dos carotenoides (LANDRUM; BONE, 2001; ROBERTS et al., 2008; SASAKI et al., 2009; KIJLSTRA et al., 2012; LI et al., 2012; JOHNSON et al., 2013) e também com a ação anti-inflamatória, uma vez que, a neuroinflamação é um dos fatores que contribuem para o prejuízo cognitivo e a Doença de Alzheimer (KRITCHEVSKY et al., 2000; EIKELENBOOM; GOOL, 2004; JOHNSON, 2005; EIKELENBOOM et al., 2006; HENSLEY, 2010; JOHNSON et al., 2013; WANG et al., 2013).

Assim, baseado nas evidências, a luteína pode ser considerada para atuar como um alvo terapêutico no desenvolvimento de drogas capazes de modificar a evolução natural dos danos neuronais e déficits de memória induzidos por etanol, possibilitando identificar estratégias farmacológicas eficazes para esse tratamento.

Apesar de todos os estudos já existentes sobre carotenoides e funções cognitivas, o efeito da luteína sobre a prevenção do déficit de memória induzido por etanol ainda não tem sido investigado. Portanto, a realização deste trabalho é

importante para determinar os efeitos da luteína, um possível candidato no tratamento dos déficits de memória induzidos por etanol.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. ANIMAIS E REAGENTES

Nos experimentos, foram utilizados 182 ratos Wistar machos, adultos (60 - 90 dias de idade), pesando entre 250-300 g, procedentes do Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Campus Cascavel. Os animais foram abrigados em caixas de polipropileno de 41x34x16 cm, sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com acesso à água e ração para animais de laboratório (Algomix, Ouro Verde do Oeste, PR, Brasil) *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram submetidos, avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UNIOESTE (01/2016) e os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, determinado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), segundo as Leis, Normativas e Resoluções vigentes.

A luteína (12%) foi obtida a partir de fornecedores locais e dissolvida em óleo de oliva, imediatamente antes da administração. O etanol foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e diluído em solução salina (NaCl 0,9%). Todos os outros reagentes utilizados eram de grau analítico e adquiridos de fornecedores locais.

### 4.2. TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

A tarefa, realizada em uma caixa de madeira (60 x 40 x 30 cm), consiste de três fases distintas, habituação, treino e teste. Na sessão de habituação, com duração de 10 minutos, os animais foram permitidos explorar a caixa livremente. Nesta sessão foram contados o número de cruzamentos (crossing) e as respostas de levantar (rearing), para avaliação da atividade locomotora e exploratória dos

animais. Para esta avaliação a caixa de madeira teve o assoalho marcado, dividindo a mesma em 12 áreas iguais.

Na sessão de treino, realizada 24 horas após a habituação, o animal foi apresentado, durante 10 minutos, a dois objetos idênticos. Na sessão de teste, realizada 24 horas após o treino, um dos objetos foi substituído por um novo. Durante ambas as sessões (treino e teste), foram determinados os tempos de exploração do animal com os objetos, sendo considerado exploração quando o animal fica com o focinho até 0,5 cm do objeto. O índice de discriminação foi então calculado, pela diferença do tempo gasto para explorar o objeto novo (B) e o familiar (A) x 100 dividido pela soma do tempo gasto para explorar o objeto novo (B) e o familiar (A), e usado como um parâmetro cognitivo  $\{[T \text{ novo (B)} - T \text{ familiar (A)}] / [T \text{ novo (B)} + T \text{ familiar (A)}] \times 100\}$ .

### **4.3. DETERMINAÇÃO DOS INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

#### **4.3.1. Preparação dos tecidos**

Imediatamente após a sessão de teste da tarefa de reconhecimento de objetos, os animais foram eutanasiados, o hipocampo e córtex cerebral foram removidos, pesados, e homogeneizados em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). O homogenato resultante foi então centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C para a determinação dos indicadores enzimáticos e não enzimáticos do estresse oxidativo.

O teor de proteína foi medido colorimetricamente utilizando o método de Bradford (1976), e a albumina de soro bovino foi utilizada (1 mg/mL) como padrão.

#### **4.3.2. Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método descrito por Misra e Fridovich (1972). Este método baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação da adrenalina em adrenocromo. Resumidamente, a fração do sobrenadante (20-60 µl) foi adicionada a um meio contendo tampão de glicina (50 mM; pH 11) e adrenalina (1 mM). A análise cinética da SOD foi iniciada após a

adição de adrenalina, a 38 °C, e a reação de cor foi medida a 480 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a velocidade de auto-oxidação da epinefrina em 50% a 38 °C, e os resultados foram expressos em unidades (U) SOD/mg de proteína.

#### **4. 3. 3. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A peroxidação lipídica foi estimada pela medição de TBARS e foi expressa em termos de conteúdo de malondialdeído (MDA), de acordo com o método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Neste método, o MDA, um produto final da peroxidação dos ácidos graxos, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo corado. O conteúdo de TBARS foi medido em um meio contendo 100 µl do homogenato de tecido do hipocampo ou do córtex cerebral, 15 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, 60 µL de tampão de ácido acético (2,5 M, pH 3,4), e 115 µL de TBA 0,81%. A mistura foi aquecida a 95 °C durante 120 minutos em banho-maria. Após o resfriamento até temperatura ambiente, a absorbância foi medida no sobrenadante a 532 nm. Os resultados foram calculados como µmol de MDA/mg de proteína.

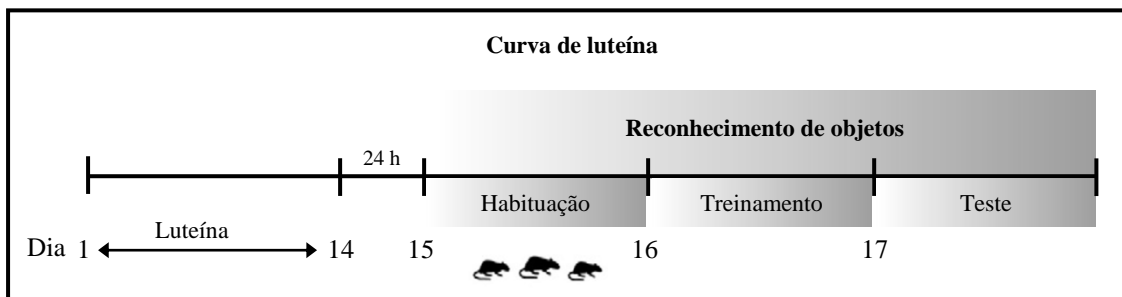
#### **4.3.4. Tiol não proteico (NPSH)**

Os níveis de NPSH foram determinados de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1959) com algumas modificações. As amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA 10%) e subsequentemente, centrifugadas a 3.000 x g durante 10 minutos. Após a centrifugação, a fração do sobrenadante (60 µl) foi adicionada a um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio (1 M, pH 7,4) e 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB, 10 mM). Os níveis de NPSH foram medidos por espectrofotometria a 412 nm. Os resultados foram calculados usando uma curva padrão construída com glutathiona reduzida (GSH) e corrigida com base no teor de proteínas. Os resultados foram calculados como nmol NPSH/mg de proteína.

#### 4.4. DESENHO EXPERIMENTAL

##### 4.4.1. Experimento 1 - Efeito da luteína sobre o desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos

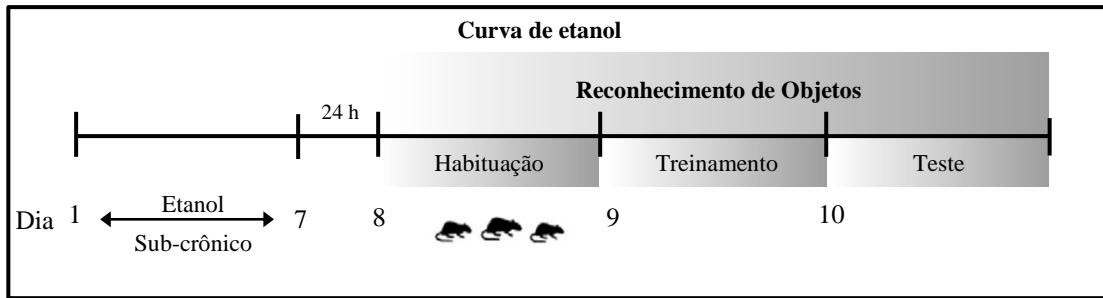
Uma curva dose-efeito de luteína foi realizada para avaliar o efeito na tarefa de reconhecimento de objetos e definir a dose para os experimentos subsequentes. Os ratos foram pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos que receberam luteína (15, 50 e 100 mg/kg) ou óleo de oliva (1 mL/kg) por gavagem oral, uma vez por dia durante 14 dias. No dia 15, os ratos foram avaliados na tarefa de reconhecimento de objetos. Luteína (50 mg/kg) é descrita melhorar déficits causados pela doença de Huntington (BINAWADE; JAGTAP, 2013). O esquema de tratamento está representado na Fig. 6.



**Figura 6 - Representação esquemática do protocolo experimental: curva dose-efeito de luteína**

##### 4.4.2. Experimento 2 - Efeito da administração sub-crônica de etanol sobre o desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos

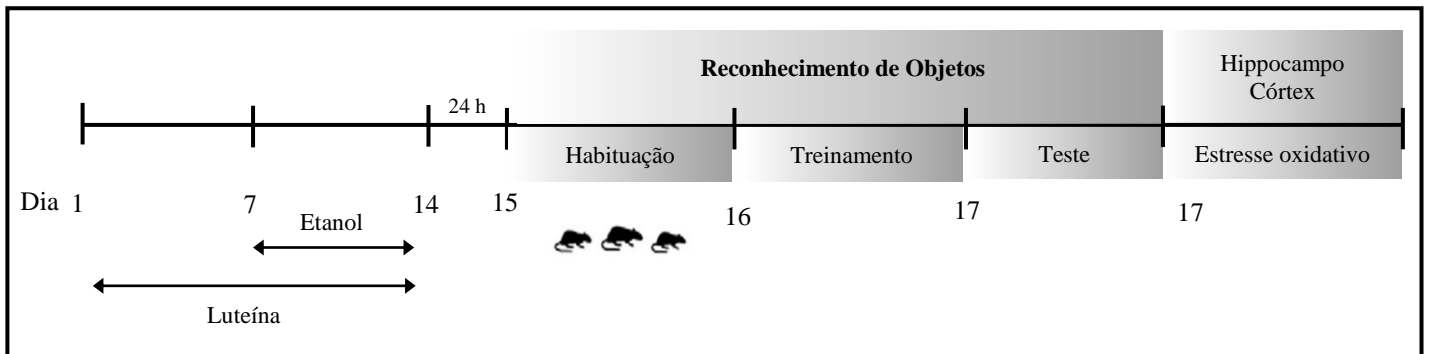
Uma curva dose-efeito de etanol foi realizada para definir a dose que induz déficit de memória para os experimentos subsequentes. Os ratos foram pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos que receberam etanol (0,3, 1 ou 3 g/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%, 10 mL/kg) por gavagem oral, uma vez por dia durante 7 dias. No dia 8, os ratos foram avaliados na tarefa de reconhecimento de objetos. O intervalo da dose foi selecionado com base em estudos anteriores que mostram que a administração de etanol (2 ou 3,4 g/kg) causa déficit de memória (GOMEZ et al., 2013; KUZMIN et al., 2013). O esquema de tratamento está representado na Fig. 7.



**Figura 7 - Representação esquemática do protocolo experimental: curva dose-efeito de etanol**

#### **4.4.3. Experimento 3 - Efeito da luteína sobre o déficit de memória e indicadores de estresse oxidativo induzidos pela administração sub-crônica de etanol**

Uma vez determinado que luteína *per se* na dose de 50 mg/kg não alterou a memória e que etanol (3 g/kg) induziu o déficit de memória, foi testado se esta dose de luteína previne o déficit de memória induzido pela administração sub-crônica de etanol. Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos que receberam luteína (50 mg/kg) ou óleo de oliva (1 mL/kg) por gavagem oral, uma vez por dia durante 14 dias. No dia 8 cada grupo foi novamente dividido aleatoriamente em dois grupos que receberam etanol (3 g/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%, 10 mL/kg) por gavagem oral, uma vez por dia durante 7 dias. No dia 15, cada rato foi avaliado na tarefa de reconhecimento de objetos, e em seguida, o hipocampo e córtex cerebral foram removidos para determinação dos indicadores de estresse oxidativo (SOD, TBARS e NPSH). O esquema de tratamento está representado na Fig. 8.



**Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental: administração de luteína e etanol**

#### 4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa GraphPad Prism 5 foi utilizado para a análise estatística e para a plotagem dos gráficos. As análises estatísticas foram realizadas por Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do teste post hoc de Bonferroni, dependendo do experimento. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Todos os dados são apresentados como média e erro padrão (SEM).



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, p. 180-187, 2001.
- ACHESON, S. K.; ROSS, E. L.; SWARTZWELDER, H. S. Age-independent and dose-response effects of ethanol on spatial memory in rats. **Alcohol**, v. 23, p. 167-175, 2001.
- AGGLETON, J. P.; VANN, S. D.; OSWALD, C. J. P.; GOOD, M. Identifying cortical inputs to the rat hippocampus that subserve allocentric spatial processes: A simple problem with a complex answer. **Hippocampus**, v. 10, p. 466–474, 2000.
- AHMED, S. S.; LOTT, M. N.; MARCUS, D. M. The macular xanthophylls. **Survey of Ophthalmology**, v. 50, p. 183-93, 2005.
- AKBARALY, N. T.; FAURE, H.; GOURLET, V.; FAVIER, A.; BERR, C. Plasma carotenoid levels and cognitive performance in an elderly population: results of the EVA Study. **Journal of Gerontology: Medical Sciences**, v. 62, p. 308–16, 2007.
- AL-CHALABI, A.; TURNER, M. R.; DELAMONT, R. S. **The brain: A beginner's guide**. England: One World, 2006.
- ALLMAN, J. **Evolving Brains**. Scientific American Library. W. H. Freeman, 2000.
- AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Progress in Brain Research**, v. 163, p. 3–22, 2007.
- BADSHAH, H.; KIM, T. H.; KIM, M. J.; AHMAD, A.; ALI, T.; YOON, G. H.; NASEER, M. I.; KIM, M. O. Apomorphine attenuates ethanol-induced neurodegeneration in the adult rat cortex. **Neurochemistry International**, v. 74, p. 8–15, 2014.
- BAGCHI, K.; PURI, S. Free radicals and antioxidants in health and disease. **East Mediterranean Health Jr**, v. 4, p. 350–360, 1998.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências - Desvendando o sistema nervoso**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- BENJAMINS, J. A.; NEDELKOSKA, L.; LISAK, R. P.; HANNIGAN, J. H.; SOKOL, R. J. Cytokines reduce toxic effects of ethanol on oligodendroglia. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 1677–1686, 2011.
- BENNETT, R. H.; CHEREK, D. R.; SPIGA, R. Acute and chronic alcohol tolerance in humans: effects of dose and consecutive days of exposure. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 17, p. 740-745, 1993.

BERESFORD, T. P.; ARCINIEGAS, D. B.; ALFERS, J.; CLAPP, L.; MARTIN, B.; DU, Y.; CLAPP, L.; MARTIN, B.; DU, Y.; LIU, D.; SHEN, D.; DAVATZIKOS, C. Hippocampus volume loss due to chronic heavy drinking. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 30, p. 1866–1870, 2006.

BERLESE, D. B.; SAUZEM, P. D.; CARATI, M. C.; GUERRA, G. P.; STIEGEMEIER, J. A.; MELLO, C. F.; RUBIN, M. A. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 83, p. 48–53, 2005.

BERNABEU, R.; SCHMITZ, P.; FAILLACE, M. P.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. **NeuroReport**, v. 7, p. 585–588, 1996.

BERNSTEIN, J.; BASILIO, C.; MARTINEZ, B. Ethanol sulfation by the pulmonary ethanol metabolizing system (PET). **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 68, 219–234, 1990.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory”. **Journal home: Nature Protocols**, v. 1, p.1306–1311, 2006.

BINAWADE, Y.; JAGTAP, A. Neuroprotective effect of lutein against 3-nitropropionic acid-induced Huntington’s disease-like symptoms: possible behavioral, biochemical, and cellular alterations. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, p. 934–943, 2013.

BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. Microbial Xanthophylls. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 445–455, 2005.

BLANCO, A. M.; GUERRI, C. Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL-1RI receptors. **Frontiers Bioscience**, v.12, p. 2616–2630, 2007.

BLANCO, A. M.; VALLÉS, S. L.; PASCUAL, M.; GUERRI, C. Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 6893–6899, 2005.

BOHBOT, V. D.; ALLEN, J. J.; NADEL, L. Memory deficits characterized by patterns of lesions to the hippocampus and parahippocampal cortex. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 911, p. 355–68, 2000.

BONE, R. A.; LANDRUM, J. T.; TARSIS, S. L. Preliminary identification of the human macular pigment. **Vision Research**, v. 25, p. 1531-5, 1985.

BONINI, J. S.; DA SILVA, W. C.; DA SILVEIRA, C. K.; KÖHLER, C. A.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine facilitates consolidation of fear extinction. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 7, p. 1–9, 2011.

BOUCHERY, E. E.; HARWOOD, H. J.; SACKS, J. J.; SIMON, C. J.; BREWER, R. D. Economic costs of excessive alcohol consumption in the U.S., 2006. **American Journal Preventive Medicine**, v. 41, p. 516-524, 2011.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREWER, J. B.; ZHAO, Z.; DESMOND, J. E.; GLOVER, G. H.; GABRIELI, J. D. E. Making Memories: Brain Activity that Predicts How Well Visual Experience Will Be Remembered. **Science**, v. 281, p. 1185–1187, 1998.

BROADBENT, N. J.; SQUIRE, L. R.; CLARK, R. E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **PNAS**, v. 101, p. 14515–14520, 2004.

BURKE, S. N.; BARNES, C. A. Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. **Trends in Neurosciences**, v. 33, p. 153–161, 2010.

BUSCEMI, L.; TURCHI, C. An overview of the genetic susceptibility to alcoholism. **Medicine, Science and the Law**, v. 51, p. S2–6, 2011.

CACACE, S.; PLESCIA, F.; LA BARBERA, M.; CANNIZZARO, C. Evaluation of chronic alcohol self-administration by a 3-bottle choice paradigm in adult male rats. Effects on behavioural reactivity, spatial learning and reference memory. **Behavioural Brain Research**, v. 219, p. 213–220, 2011.

CALABRESE, V.; TESTA, G.; RAVAGNA, A.; BATES, T. E.; STELLA, A. M. HSP70 induction in the brain following ethanol administration in the rat: regulation by glutathione redox state. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 397–400, 2000.

CALVO, M. M. Lutein: a valuable ingredient of fruit and vegetables. **Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 671-696, 2005.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free radicals chemistry. **British Medical Bulletin**, v. 49, p. 481–493, 1993.

CHOI, S. H.; AID, S.; BOSETTI, F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. **Trends Pharmacological Sciences**, v. 30, p. 174–181, 2009.

CHRISTEN, W. G.; LIU, S.; GLYNN, R. J.; GAZIANO, J. M.; BURING, J. E. Dietary carotenoids, vitamins C and E, and risk of cataract in women: a prospective study. **Archives of Ophthalmology**, v. 126, p. 102–109, 2008.

CIPPITELLI, A.; DAMADZIC, R.; FRANKOLA, K.; GOLDSTEIN, A.; THORSELL, A.; SINGLEY, E.; ESKAY, R. L.; HEILIG, M. Alcohol-Induced Neurodegeneration,

Suppression of Transforming Growth Factor-B, and Cognitive Impairment in Rats: Prevention by Group II Metabotropic Glutamate Receptor Activation. **Biological Psychiatry**, v. 67, p. 823–830, 2010a.

CIPPITELLI, A.; ZOOK, M.; BELL, L.; DAMADZIC, R.; ESKAY, R. L.; SCHWANDT, M.; HEILIG, M. Reversibility of object recognition but not spatial memory impairment following binge-like alcohol exposure in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, p. 538–546, 2010b.

CLEVIDENCE, B. A.; BIERI, J. G. Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. **Methods Enzymology**, v. 214, p. 33–46, 1993.

COLLINS, M. A.; CORSO, T.; NEAFSEY, E. J. Neuronal degeneration in rat cerebrocortical and olfactory regions during subchronic “binge” intoxication with ethanol: Possible explanation for olfactory deficits in alcoholics. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 20, p. 284 –292, 1996.

COMBS, G. F. **The Vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health**. 4. ed. Burlington, Massachusetts: Elsevier Academic Press, 2012.

COOPER, M. L.; FRONE, M. R.; RUSSELL, M.; MUDAR, P. Drinking to regulate positive and negative emotions: a motivational model of alcohol use. **Journal of Personality and Social Psychology**, v. 69, p. 990–1005, 1995.

CORRAO, G.; RUBBIATI, L.; BAGNARDI, V.; ZAMBON, A.; POIKOLAINEN, K. Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis. **Addiction**, v. 95, p. 1505–1523, 2000.

CRAFT, N. E.; HAITEMA, T. B.; GARNETT, K. M.; FITCH, K. A.; DOREY, C. K. Carotenoid, tocopherol, and retinol concentrations in elderly human brain. **The Journal of Nutrition Health and Aging**, v. 8, p. 156–162, 2004.

CREWS, F. T.; COLLINS, M. A.; DLUGOS, C.; LITTLETON, J.; WILKINS, L.; NEAFSEY, E. J.; PENTNEY, R.; SNELL, L. D.; TABAKOFF, B.; ZOU, J.; NORONHA, A. Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why? **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 28, p. 350–364, 2004.

CREWS, F. T.; NIXON, K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. **Alcohol Alcohol**, v. 44, p. 115–127, 2009.

CROCE, D.; CROCE JÚNIOR, D. **Manual de Medicina Legal**. 8. ed. São Paulo: Saraiva, 2012.

DALLA BARBA, G.; PARLATO, V.; JOBERT, A.; SAMSON, Y.; PAPPATA, S. Cortical networks implicated in semantic and episodic memory: common or unique? **Cortex**, v. 34, p. 547-561, 1998.

DAS, S. K.; MUKHERJEE, S. Long-term ethanol consumption leads to lung tissue oxidative stress and injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, p. 414-420, 2010.

DAS, S. K.; MUKHERJEE, S.; VASUDEVAN, D. M. Effects of Long Term Ethanol Consumption on Cell Death in Liver. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 26, p. 84–87, 2011.

DIAS, I. H.; POLIDORI, M. C.; LI, L.; WEBER, D.; STAHL, W.; NELLES, G.; GRUNE, T.; GRIFFITHS, H. R. Plasma levels of HDL and carotenoids are lower in dementia patients with vascular comorbidities. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 40, p. 399–408, 2014.

DOSKELAND, S. O.; MARONDE, E.; GJERTSEN, B. T. The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase — functionally different or redundant? **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1178, p. 249–258, 1993.

DURAK, D.; KALENDER, S.; UZUN, F. G.; DEMIR, F.; KALENDER, Y. Mercury chloride-induced oxidative stress in human erythrocytes and the effect of vitamins C and E in vitro. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 488–495, 2010.

DWYER, J. H.; NAVAB, M.; DWYER, K. M.; HASSAN, K.; SUN, P.; SHIRCORE, A.; HAMA-LEVY, S.; HOUGH, G.; WANG, X.; DRAKE, T.; MERZ, C. N.; FOGELMAN, A. M. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. **Circulation**, v. 103, p. 2922–2927, 2001.

EBADI, M. **Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases**. Arizona: Prominent Press, 2001.

EICHENBAUM, H., YONELINAS, A. P., RANGANATH, C. The medial temporal lobe and recognition memory. **Annual Review of Neuroscience**, v. 30, p. 123–152, 2007.

EIKELENBOOM, P.; GOOL, V. W. A. Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 111, p. 281–294, 2004.

EIKELENBOOM, P.; VEERHUIS, R.; SCHEPER, W.; ROZEMULLER, A. J.; VAN GOOL, W. A.; HOOZEMANS, J. J. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 113, p. 1685–1695, 2006.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.

ERDMAN, J. W. Jr.; BIERER, T. L.; GUGGER, E. T. Absorption and transport of carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 691, p. 76–85, 1993.

ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Review Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2986–3008, 2007.

FAINGOLD, C. L. The Majchrowicz binge alcohol protocol: an intubation technique to study alcohol dependence in rats. **Current Protocols in Neuroscience**, chapter 9, unit 9.28, 2008.

FARR, S. A.; SCHERRER, J. F.; BANKS, W. A.; FLOOD, J. F.; MORLEY, J. E. Chronic ethanol consumption impairs learning and memory after cessation of ethanol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 29, p. 971–982, 2005.

FAULKS, R.; SOUTHON, S. "Dietary carotenoids". **Nutrition and Food Science**, v.97, p. 246–250, 1997.

FEENEY J, FINUCANE C, SAVVA GM, CRONIN, H.; BEATTY, S.; NOLAN, J. M.; KENNY, R. A. Low macular pigment optical density is associated with lower cognitive performance in a large, population-based sample of older adults. **Neurobiology of Aging**. v. 34, p. 2449-56, 2013.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FISKUM, G.; ROSENTHAL, R. E.; VERECZKI, V.; MARTIN, E.; HOFFMEN, G. E.; CHINOPOULOS, C.; KOWALTOWSKI, A. Protection against ischemic brain injury by inhibition of mitochondrial oxidative stress. **Journal Bioenergetics Biomembranes**, v. 36, p. 347–352, 2004.

FURR, H. C.; CLARK, R. M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, p. 364–377, 1997.

GALLICCHIO L, BOYD K, MATANOSKI G.; TAO, X. G.; CHEN, L.; LAM, T. K.; SHIELS, M.; HAMMOND, E.; ROBINSON, K. A.; CAULFIELD, L. E.; HERMAN, J. G.; GUALLAR, E.; ALBERG, A. J. Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 372–383, 2008.

GAO, S.; QIN, T.; LIU, Z.; CACERES, M. A.; RONCHI, C. F.; CHEN, C. Y.; YEUM, K. J.; TAYLOR, A.; BLUMBERG, J. B, LIU, Y.; SHANG, F. Lutein and zeaxanthin supplementation reduces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in human lens epithelial cells. **Molecular Vision**, v. 17, p. 3180-190, 2011.

GAO, Y. Y.; XIE, Q. M.; JIN, L.; SUN, B. L.; JI, J.; CHEN, F.; MA, J. Y.; BI, Y. Z. Supplementation of xanthophylls decreased proinflammatory and increased anti-inflammatory cytokines in hens and chicks. **British Journal Nutrition**, v. 108, p. 1746–55, 2012.

GARCÍA-MORENO, L. M.; CIMADEVILLA, J. M. Acute and chronic ethanol intake: effects on spatial and non-spatial memory in rats. **Alcohol**, v. 46, p. 757–62, 2012.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 959- 975, 2001.

GILLETTE-GUYONNET, S.; SECHER, M.; VELLAS, B. Nutrition and neurodegeneration: epidemiological evidence and challenges for future research. **British Journal Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 738–55, 2013.

GIOVANNUCCI, E. A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, p. 852– 859, 2002.

GLOBAL ROAD SAFETY PARTNERSHIP. **Drinking and driving – an international good practice manual**. Geneva: Global Road Safety Partnership, 2007.

GOMEZ, J.; LEWIS, M.; SEBASTIAN, V.; SERRANO, P.; LUINE, V. N. Alcohol administration blocks stress-induced impairments in memory and anxiety, and alters hippocampal neurotransmitter receptor expression in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 63, p. 659–666, 2013.

GOODRICH-HUNSAKER, N. J.; HOPKINS, R. O. Spatial memory deficits in a virtual radial arm maze in amnesic participants with hippocampal damage. **Behavioral Neuroscience**, v. 124, p. 405-13, 2010.

GOODRICH-HUNSAKER, N. J.; LIVINGSTONE, S. A.; SKELTON, R. W.; HOPKINS, R. O. Spatial deficits in a virtual water maze in amnesic participants with hippocampal damage. **Hippocampus**, v. 20, p. 481– 491, 2010.

GOULINET, S.; CHAPMAN, M. J. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols oxygenated and hydrocarbon carotenoids: Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 17, p. 786–796, 1997.

GRANT, B. F.; DAWSON, D. A.; STINSON, F. S.; CHOU, S. P.; DUFOUR, M. C.; PICKERING, R. P. The 12 month prevalence and trends in DSM-IV alcohol abuse and dependence: United States, 1991-1992 and 2001-2002. **Drug Alcohol Depend**, v. 74, p. 223–34, 2004.

GUERRA, G. P.; MELLO, C. F.; BOCHI, G. V.; PAZINI, A. M.; FACHINETTO, R.; DUTRA, R. C.; CALIXTO, J. B.; FERREIRA, J. RUBIN, M. A. Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, p. 324–332, 2011.

GUERRA, G. P.; MELLO, C. F.; BOCHI, G. V.; PAZINI, A. M.; ROSA, M. M.; FERREIRA, J.; RUBIN, M. A. Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A. **Journal of Neurochemistry**, 2012.

GUERRA, G. P.; MELLO, C. F.; SAUZEM, P. D.; BERLESE, D. B.; FURIAN, A. F.; TABARELLI, Z.; RUBIN, M. A. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology**, v. 186, p. 150–158, 2006.

GUTIERRES, J. M.; CARVALHO, F. B.; ROSA, M. M.; SCHMATZ, R.; RODRIGUES, M.; VIEIRA, J. M.; MAZZANTI, C. M.; MORSCH, V. M.; RUBIN, M. A.; SCHETINGER, M. R. C.; SPANEVELLO, R. M. Protective effect of  $\alpha$ -Tocopherol on memory deficits and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and acetylcholinesterase activities in rats with diet-induced hypercholesterolemia. **Biomedicine and Aging Pathology**, v. 2, p. 73–80, 2012.

GUTIERRES, J. M.; CARVALHO, F. B.; SCHETINGER, M. R. C.; MARISCO, P.; AGOSTINHO, P.; RODRIGUES, M.; RUBIN, M. A.; SCHMATZ, R.; DA SILVA C. R.; DE P COGNATO, G.; FARIAS, J. G.; SIGNOR, C.; MORSCH, V. M.; MAZZANTI, C. M.; BOGO, M.; BONAN, C. D.; SPANEVELLO, R. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. **Life Sciences**, v. 96, p. 7–17, 2014.

HALL, M. D. Alcoholism and depression. **Home Healthcare Nurse Now**, v. 30, p. 543–550, 2012.

HALLIWELL, B. Radicals and other reactive species in Disease. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal Neurochemistry**, v. 97, p. 1634–1658, 2006.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. **DNA and Free Radicals**. Ellis Horwood: Chichester, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HAMULKA, J.; KOCZARA, J.; GRONEK, M. Lutein content of selected polish foods and estimation of its intake. **Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences**, v. 14/55, 201–206, 2005.

HAORAH, J.; RAMIREZ, S. H.; FLOREANI, N.; GORANTLA, S.; MORSEY, B.; PERSIDSKY, Y. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 1542–1550, 2008.

HARPER, C.; MATSUMOTO, I. Ethanol and brain damage. **Current Opinion Pharmacology**, v. 5, p. 73–78, 2005.

HARRIS, R. A. Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 23, p. 1563–1570, 1999.

HART, D. J.; SCOTT, K. J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chemistry**, v. 54, p. 101–111, 1995.



HASIN, D. S.; STINSON, F. S.; OGBURN, E.; GRANT, B. F. Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV alcohol abuse and dependence in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Archives General Psychiatry**, v. 64, p. 830–842, 2007.

HEFFERNAN, T. M. The impact of excessive alcohol use on prospective memory: a brief review. **Current Drug Abuse Reviews**, v. 1, p. 36–41, 2008.

HENSLEY, K. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation. **Journal Alzheimers Disease**, v. 21, p. 1–14, 2010.

HOF, K. H. V.; WEST, C. E.; WESTSTRATE, J. A.; HAUTVAST, J. G. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 503-506, 2000.

HOLDEN, J. M.; ELDRIDGE, A. L.; BEECHER, G. R.; BUZZARD, I. M.; BHAGWAT, S.; DAVIS, C. S.; DOUGLASS, L. W.; GEBHARDT, S.; HAYTOWITZ, D.; SCHAKEL, S. Carotenoid content of U.S. foods: An update of the database. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 12, p. 169–196, 1999.

IBRAHIM, M.; HASSAN, W.; MEINERZ, D. F.; LEITE, G. O.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Ethanol-Induced Oxidative Stress: The Role of Binaphthyl Diselenide as a Potent Antioxidant. **Biological Trace Element Research**, v. 147, p. 309–314, 2012.

INEU, R. P.; OLIVEIRA, C. S.; OLIVEIRA, V. A.; MORAES-SILVA, L.; LUZ, S. C. A.; PEREIRA, M. E. Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 522-529, 2013.

INEU, R. P.; PEREIRA, M. E.; ASCHNER, M.; NOGUEIRA C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3023-3029, 2008.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 63, p. 19-32, 1995.

JACOBS, A. H.; TAVITIAN, B. Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, p. 1393–1415, 2012.

JARVENPAA, T.; RINNE, J. O.; KOSKENVUO, M.; RAIHA, I.; KAPRIO, J. Binge Drinking in Midlife and Dementia Risk. **Epidemiology**, v. 16, p. 766–771, 2005.

JOHNSON, E. J. The role of carotenoids in human health. **Nutrition in Clinical Care**, v. 5, p. 56-65, 2002.

JOHNSON, E. J. Obesity, lutein metabolism, and age-related macular degeneration: a web of connections. **Nutrition Reviews**, v. 63, p. 9–15, 2005.

JOHNSON, E. J. A possible role for lutein and zeaxanthin in cognitive function in the elderly. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, p. 1161S-1165S, 2012.

JOHNSON, E. J.; MCDONALD, K.; CALDARELLA, S. M.; CHUNG, H-Y.; TROEN, A. M.; SNODDERLY, D. M. Cognitive findings of an exploratory trial of docosahexaenoic acid and lutein supplementation in older women. **Nutritional Neuroscience**, v. 11, p. 75–83, 2008.

JOHNSON, E. J.; VISHWANATHAN, R.; JOHNSON, M. A.; HAUSMAN, D. B.; DAVEY, A.; SCOTT, T. M.; GREEN, R. C.; MILLER, L. S.; GEARING, M.; WOODARD, J.; NELSON, P. T.; CHUNG, H-Y.; SCHALCH, W.; WITTEW, J.; POON, L. W. Relationship between Serum and Brain Carotenoids,  $\alpha$ -Tocopherol, and Retinol Concentrations and Cognitive Performance in the Oldest Old from the Georgia Centenarian Study. **Journal of Aging Research**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

JOLLOW, D. J.; MITCHELL, J. R.; ZAMPAGLIONE, N.; GILLETTE, J. R. Bromobenzene induced liver necrosis: protective role of glutathione and evidence for 3,4 bromobenzenoxide as the hepatotoxic intermediate. **Pharmacology**, v. 11, p. 151–169, 1974.

JONES, A. W. Measuring and reporting the concentration of acetaldehyde in human breath. **Alcohol and Alcoholism**, v. 30, p. 271–285, 1995.

JOSEPH, J.; COLE, G.; HEAD, E.; INGRAM, D. Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 12795–12801, 2009.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neural Science**, 5. ed. McGraw-Hill/Appleton and Lange, 2000.

KANG, J. H.; ASCHERIO, A.; GRODSTEIN, F. Fruit and vegetable consumption and cognitive decline in aging women. **Annals of Neurology**, v. 57, p. 713–720, 2005.

KASSEL, J. D.; EVATT, D. P.; GREENSTEIN, J. E.; WARDLE, M. C.; YATES, M. C.; VEILLEUX, J. C. The acute effects of nicotine on positive and negative affect in adolescent smokers. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 116, p. 543-553, 2007.

KASSEL, J. D.; JACKSON, S. I.; UNROD, M. Generalized expectancies for negative mood regulation and problem drinking among college students. **Journal of Studies Alcohol and Drugs**, v. 61, p. 332–340, 2000.

KAUR, H.; CHAUHAN, S.; SANDHIR, R. Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 1435–43, 2011.

KAUSHALL, P. I.; ZETIN, M.; SQUIRE, L. R. "A psychosocial study of chronic, circumscribed amnesia", **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 169, p. 383-389, 1981.

KESSE-GUYOT, E.; ANDREEVA, V. A.; DUCROS, V.; JEANDEL, C.; JULIA, C.; HERCBERG, S.; GALAN, P. Carotenoid-rich dietary patterns during midlife and subsequent cognitive function. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 915–923, 2014.

KESSOVA, I.; CEDERBAUM, A. I. CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. **Current Molecular Medicine**, v. 3, p. 509–518, 2003.

KIJLSTRA, A.; TIAN, Y. T.; KELLY, E. R.; BERENDSCHOT, T. T. J. M. Lutein: More than just a filter for blue light. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 31, p. 303-315, 2012.

KIKO, T.; NAKAGAWA, K.; TSUDUKI, T.; SUZUKI, T.; ARAI, H.; MIYAZAWA, T. Significance of lutein in red blood cells of Alzheimer's disease patients. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 28, p. 593-600, 2012.

KIM, J. H.; NA, H. J.; KIM, C. K.; KIM, J. Y.; HA, K. S.; LEE, H.; CHUNG, H. T.; KWON, H. J.; KWON, Y. G.; KIM, Y. M. The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF- $\kappa$ B-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF- $\kappa$ B-inducing kinase pathways: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NF- $\kappa$ B activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 885–896, 2008.

KIMURA, M.; HIGUCHI, S. Genetics of alcohol dependence. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 65, p. 213-25, 2011.

KÖHNKE, M. D. Approach to the genetics of alcoholism: A review based on pathophysiology. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 160–177, 2008.

KOPPENOL, W. H. Names for inorganic radicals (IUPAC recommendations 2000). **Pure and Applied Chemistry**, 72, p. 437-46, 2000.

KORNISIUK, E.; SNITCOFSKY, M.; BLANCO, C.; HARVEY, A. L.; STONE, T. W.; JERUSALINSKY, D. Memory impairment in rats by hippocampal administration of the serine protease subtilisin. **Behavioural Brain Research**, v. 219, p. 63-7, 2011.

KRINSKY, N. I.; LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual Review Nutrition**, v. 23, p. 171-201, 2003.

KRISHNASWAMY, R.; DEVARAJ, S. N.; PADMA, V. V. Lutein protects HT-29 cells against Deoxynivalenol-induced oxidative stress and apoptosis: prevention of NF- $\kappa$ B nuclear localization and down regulation of NF- $\kappa$ B and Cyclo-Oxygenase-2 expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 50–60, 2010.

KRITCHEVSKY, S. B.; BUSH, A. J.; PAHOR, M.; GROSS, M. D. "Serum carotenoids and markers of inflammation in nonsmokers," **American Journal of Epidemiology**, v. 152, p. 1065–1071, 2000.

KUSSMANN, M.; AFFOLTER, M.; NAGY, K.; HOLST, B.; FAY, L. B. Mass spectrometry in nutrition: Understanding dietary health effects at the molecular level. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 727–750, 2007.

KUZMIN, A.; CHEFER, V.; BAZOV, I.; MEIS, J.; ÖGREN, S. O.; SHIPPENBERG, T. BAKALKIN, G. Upregulated dynorphin opioid peptides mediate alcohol-induced learning and memory impairment. **Translational Psychiatry**, v. 3, p. e310, 2013.

KUZMIN, A.; LILJEQUIST, S.; MEIS, J.; CHEFER, V.; SHIPPENBERG, T.; BAKALKIN, G. Repeated moderate-dose ethanol bouts impair cognitive function in Wistar rats. **Addiction Biology**, v. 17, p. 132–140, 2012.

LAI, S. M.; GRAY, J. I.; FLEGAL, C. J.; COOPER, T. Deposition of carotenoids in eggs from hens fed diets containing saponified and unsaponified oleoresin paprika. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 72, p. 166-170, 1996.

LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Lutein, zeaxanthin and the macular pigment. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 385, p. 28–40, 2001.

LEE, E. H.; FAULHABER, D.; HANSON, K. M.; DING, W. H.; PETERS, S.; KODALI, S.; GRANSTEIN, R. D. Dietary lutein reduces ultraviolet radiation-induced inflammation and immunosuppression. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, p. 510-517, 2004.

LI, S-Y.; FU, Z. J.; MA, H.; JANG, W. C.; SO, K. F.; WONG, D.; LO, A. C. Y. Effect of lutein on retinal Neurons and oxidative stress in a model of acute retinal Ischemia/Reperfusion. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 50, 836-843, 2009.

LI, S-Y.; LO, A. C. Y. Lutein protects RGC-5 cells against hypoxia and oxidative stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 2109–2117, 2010.

LI, S-Y.; YANG, D.; FU, Z. J.; WOO, T.; WONG, D.; LO, A. C. Y. Lutein enhances survival and reduces neuronal damage in a mouse model of ischemic stroke. **Neurobiology of Disease**, v. 45, p. 624–632, 2012.

LIEBER, C. S. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. **Alcohol**, v. 34, p. 9–19, 2004.

MANGELS, A. R.; HOLDEN, J. M.; BEECHER, G. R.; FORMAN, M. R.; LANZA, E. Carotenoid contents of fruits and vegetables: an evaluation of analytical data. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 93, p. 284–296, 1993.

MARLIN, D.J.; FENN, K.; SMITH, N.; DEATON, C. D.; ROBERTS, C. A.; HARRIS, P. A.; DUNSTER, C.; KELLY, F. J. Changes in circulatory antioxidant status in horses

during prolonged exercise. **The Journal of Nutrition's**, v. 132, p. 1622S-1627S, 2002.

MARTIN, S. T.; KESSLER, M. **Neurologic Interventions for Physical Therapy**. 3. ed. Elsevier Health Sciences, 2015.

MCCALL, M. R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1034–1053, 1999.

MCCULLOUGH, A. J.; O'SHEA, R. S.; DASARATHY, S. Diagnosis and management of alcoholic liver disease. **Journal of Digestive Diseases**, v. 12, p. 257–262, 2011.

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

MI, W.; VAN WIJK, N.; CANSEV, M.; SIJBEN, J. W. C.; KAMPHUIS, P. J. G. H. Nutritional approaches in the risk reduction and management of Alzheimer's disease. **Nutrition**, v. 29, p. 1080–1089, 2013.

MILLER, D. B.; O'CALLAGHAN, J. P. Aging, stress and the hippocampus. **Ageing Research Reviews**, v. 4, p. 123-40, 2005.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170-3175, 1972.

MITRIRATTANAKUL, S.; LÓPEZ-VALDÉS, H. E.; LIANG, J.; MATSUKA, Y.; MACKIE, K.; FAULL, K. F.; SPIGELMAN, I. Bidirectional alterations of hippocampal cannabinoid 1 receptors and their endogenous ligands in a rat model of alcohol withdrawal and dependence. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 31, p. 855–867, 2007.

MORRIS, N. Spatial monitoring in visual working memory. **British Journal of Psychology**, v. 80, p. 333–349, 1989.

MUKAMAL, K. J.; CHUNG, H.; JENNY, N. S.; KULLER, L. H.; LONGSTRETH, W. T.; MITTLEMAN, M. A.; BURKE, G. L.; CUSHMAN, M.; BEAUCHAMP, N. J. J.; SISCOVICK, D. S. Alcohol use and risk of ischemic stroke among older adults: the cardiovascular health study. **Stroke**, v. 36, p. 1830–1834, 2005.

MUKAMAL, K. J.; CONIGRAVE, K. M.; MITTLEMAN, M. A.; CAMARGO, C. A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C.; RIMM, E. B. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. **New England Journal Medicine**, v. 348, p. 109–118, 2003.

MULDER, K. A.; INNIS, S. M.; RASMUSSEN, B. F.; WU, B. T.; RICHARDSON, K. J.; HASMAN, D. Plasma lutein concentrations are related to dietary intake, but unrelated to dietary saturated fat or cognition in young children. **Journal of Nutritional Science**, v. 3, p. 1- 08, 2014.

MÜLLER, H. Die tägliche aufnahme von carotinoiden (carotine und Xanthophylle) aus Gesamtnahrungsproben und die Carotinoidgehalte ausgewählter Gemüse und Obstarten. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, v. 35, p. 45–50, 1996.

MURIACH, M.; BOSCH-MORELL, F.; ALEXANDER, G.; BLOMHOFF, R.; BARCIA, J.; ARNAL, E.; ALMANSA, I.; ROMERO, F. J.; MIRANDA, M. Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, p. 979–984, 2006.

MURKOVIC, M.; GAMS, K.; DRAXL, S.; PFANNHAUSER, W. Development of an Austrian carotenoid database. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 435–440, 2000.

NAZIROGLU, M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular. **Neurochemical Research**, v. 34, p. 2181–2191, 2009.

NIAAA. NATIONAL INSTITUTE OF ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM. NIAAA council approves definition of binge drinking. **NIAAA Newsletter**, v. 3, n. 3, 2004.

NIIZUMA, K.; YOSHIOKA, H.; CHEN, H.; KIM, S. G.; JUNG, J. E.; KATSU, M.; OKAMI, N.; CHAN, P. H. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1802, p. 92–99, 2010.

NOVIER, A.; VAN SKIKE, C. E.; DIAZ-GRANADOS, J. L.; MITTLEMAN, G.; MATTHEWS, D. B. Acute alcohol produces ataxia and cognitive impairments in aged animals: A comparison between young adult and aged rats. **Alcoholism: Clinical Experimental Research**, v. 37, p. 1317–1324, 2013.

OBERNIER, J. A.; BOULDIN, T. W.; CREWS, F. T. Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 26, p. 547–557, 2002.

OBERNIER, J. A.; WHITE, A. M.; SWARTZWELDER, H. S.; CREWS, F. T. Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 72, p. 521–32, 2002.

OBULESU, M.; DOWLATHABAD, M. R.; BRAMHACHARI, P. V. Carotenoids and Alzheimer's disease: an insight into therapeutic role of retinoids in animal models. **Neurochemistry International**, v. 59, p. 535–541, 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.

O'NEILL, M. E.; CARROLL, Y.; CORRIDAN, B.; OLMEDILLA, B.; GRANADO, F.; BLANCO, I.; VAN DEN BERG, H.; HININGER, I.; ROUSELL, A. M.; CHOPRA, M.; SOUTHON, S.; THURNHAM, D. I. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. 499–507, 2001.

O'NEILL, P.; FIELDEN, E. M. Primary free-radical processes in DNA. **Advances in Radiation Biology**, v. 17, p. 53–120, 1993.

OSLIN, D.; Atkinson, R. M.; Smith, D. M.; Hendrie, H. Alcohol related dementia: Proposed clinical criteria. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 13, p. 203–212, 1998.

OSLIN, D. W.; CARY, M. S. Alcohol-related dementia: validation of diagnostic criteria. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 11, p. 441–7, 2003.

OZAWA, Y.; SASAKI, M.; TAKAHASHI, N.; KAMOSHITA, M.; MIYAKE, S.; TSUBOTA, K. Neuroprotective effects of lutein in the retina. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 51–56, 2012.

PAN, Y.; LUO, X.; LIU, X.; WU, L. Y.; ZHANG, Q.; WANG, L.; WANG, W.; ZUO, L.; WANG, K. S. Genome-wide association studies of maximum number of drinks. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, p. 1717–1724, 2013.

PARKER, R. S. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. **The FASEB Journal**, v. 10, p. 542–551, 1996.

PARKER, R. S. Carotenoid and tocopherol composition in human adipose tissue. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, p. 33–36, 1988.

PASCUAL, M.; BALIÑO, P.; ALFONSO-LOECHES, S.; ARAGÓN, C. M. G.; GUERRI, C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. **Brain Behavior and Immunity**, v. 25, p. 80S–91S, Supplement 1, 2011.

PASCUAL, M.; BLANCO, A. M.; CAULI, O.; MIÑARRO, J.; GUERRI, C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 541–550, 2007.

PATRA, J.; TAYLOR, B.; IRVING, H.; ROERECKE, M.; BALIUNAS, D.; MOHAPATRA, S.; REHM, J. Alcohol consumption and the risk of morbidity and mortality for different stroke types--a systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**, v. 10, p. 258, 2010.

PEIGNEUX, P.; LAUREYS, S.; DELBEUCK, X.; MAQUET, P. Sleeping brain, learning brain. The role of sleep for memory systems. **Neuroreport**, v. 12, p. A111–A124, 2001.

PFEFFERBAUM, A.; ROSENBLOOM, M. J.; FAMA, R.; SASSOON, S. A.; SULLIVAN, E. V. Transcallosal white matter degradation detected with quantitative fiber tracking in alcoholic men and women: Selective relations to dissociable Functions. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 34, p. 1201–1211, 2010.

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signaling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1163–82, 2004.

POLIDORI, M. C.; CHERUBINI, A.; STAHL, W.; SENIN, U.; SIES, H.; MECOCCI, P. Plasma carotenoid and malondialdehyde levels in ischemic stroke patients: relationship to early outcome. **Free Radical Research**, v. 36, p. 265–268, 2002.

PUNEET, K.; PADI, S. S. V.; NAIDU, P. S.; KUMAR, A. 3-Nitropropionic acid induced neurotoxicity: an animal model of Huntington's disease. **Journal of Cell and Tissue Research**, v. 7, p. 853–860, 2007.

QIN, L.; HE, J.; HANES, R. N.; PLUZAREV, O.; HONG, J. S.; CREWS, F. T. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 1–17, 2008.

RAGHAVENDRA, V.; KULKARNI, S. K. Possible antioxidant mechanism in melatonin reversal of aging and chronic ethanol-induced amnesia in plus-maze and passive avoidance memory tasks. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, p. 595–602, 2001.

RANGANATH, C.; BLUMENFELD, R. S. Doubts about double dissociations between short- and long-term memory. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 9, p. 374–380, 2005.

RAO, A. L.; BHARANI, M.; PALLAVI, V. Role of antioxidants and free radicals in health and disease. **Advances in Pharmacology and Toxicology**, v. 7, p. 29–38, 2006.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 207–216, 2007.

REDDY, P. H. "Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases," **Neuro Molecular Medicine**, v. 10, p. 291–315, 2008.

REHM, J.; MATHERS, C.; POPOVA, S.; THAVORNCHAROENSAP, M.; TEERAWATTANANON, Y.; PATRA, J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. **Lancet**, v. 373, p. 2223–33, 2009.

REIN, M. J.; RENOUF, M.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; ACTIS-GORETTA, L.; THAKKAR, S. K.; DA SILVA PINTO, M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 588–602, 2013.

REYNOLDS, B.; RICHARDS, J. B.; de WIT, H. Acute-alcohol effects on the Experiential Discounting Task (EDT) and a question-based measure of delay discounting. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 83, p. 194–202, 2006.



RIKANS, L. E.; GONZALEZ, L. P. Antioxidant protection systems of rat lung after chronic ethanol inhalation. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 14, p. 872–877, 1990.

RINALDI, P.; POLIDORI, M. C.; METASTASIO, A.; MARIANI, E.; MATTIOLI, P.; CHERUBINI, A.; CATANI, M.; CECCHETTI, R.; SENIN, U.; MECOCCHI, P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, p. 915–919, 2003.

RIVAS, I.; SANVISENS, A.; BOLAO, F.; FUSTER, D.; TOR, J.; PUJOL, R.; TORRENS, M.; REY-JOLY, C.; MUGA, R. Impact of medical comorbidity and risk of death in 680 patients with alcohol use disorders. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.37, p. E221–E227, Supplement 1, 2013.

ROBERTS, J. E.; WIELGUS, A. R.; BOYES, W. K.; ANDLEY, U.; CHIGNELL, C. F. Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human lens epithelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 228, p. 49–58, 2008.

ROBINSON, B. G.; KHURANA, S.; POHL, J. B.; LI, W. K.; GHEZZI, A.; CADY, A. M.; NAJJAR, K.; HATCH, M. M.; SHAH, R. R.; BHAT, A.; HARIRI, O.; HAROUN, K. B.; YOUNG, M. C.; FIFE, K.; HOOTEN, J.; TRAN, T.; GOAN, D.; DESAI, F.; HUSAIN, F.; GODINEZ, R. M.; SUN, J. C.; CORPUZ, J.; MORAN, J.; ZHONG, A. C.; CHEN, W. Y.; ATKINSON, N. S. A low concentration of ethanol impairs learning but not motor and sensory behavior in *Drosophila* larvae. **PLoS One**, v. 7, e37394, 2012.

ROMANCHIK, J. E.; MOREL, D. W.; HARRISON, E. H. Distribution of carotenoids and alpha-tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated in vitro. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2610–2617, 1995.

ROMERO-CALVO, I.; OCÓN, B.; MARTÍNEZ-MOYA, P.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Analytical Biochemistry**, v. 401, p318-320, 2010.

RONIS, M. J. J.; BUTURA, A.; SAMPEY, B. P.; SHANKAR, K.; PRIOR, R. L.; KOROURIAN, S.; ALBANO, E.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; PETERSEN, D. R.; BADGER, T. M. Effects of N-acetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, p. 619-630, 2005.

RUBIN, M. A.; BOEMO, R. L.; JURACH, A.; ROJAS, D. B.; ZANOLLA, G. R.; OBREGON, A. D.; SOUZA, D. O.; MELLO, C. F. Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 11, p. 57–61, 2000.

RUPINDER, S. K.; GURPREET, A. K.; MANJEET, S. Cell suicide and caspases. **Vascular Pharmacology**. v. 46, p. 383–393, 2007.

RYABININ, A. E.; MILLER, M. N.; DURRANT, S. Effects of acute alcohol administration on object recognition learning in C57BL/6J mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, p. 307-312, 2002.

SAMHSA. Substance Abuse and Mental Health Services Administration. Results from the 2014 National Survey on Drug Use and Health (NSDUH), 2014.

SASAKI, M.; OZAWA, Y.; KURIHARA, T.; KUBOTA, S.; YUKI, K.; NODA, K.; KOBAYASHI, S.; ISHIDA, S.; TSUBOTA, K. Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. **Diabetologia**, v. 53, p. 971-979, 2010.

SASAKI, M.; OZAWA, Y.; KURIHARA, T.; NODA, K.; IMAMURA, Y.; KOBAYASHI, S.; ISHIDA, S.; TSUBOTA, K. Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 50, p. 1433-1439, 2009.

SCHMIDT, L. E.; DALHOFF, K.; POULSEN, H. E. Acute Versus Chronic Alcohol Consumption in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. **Hepatology**, v. 35, p. 876-882, 2002.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry**, v. 20, p. 11–21, 1957.

SERAGENT, O.; GRIFFON, B.; CILLARD, P.; CILLARD, J. Alcohol and oxidative stress. **Pathologie Biologie**, v. 49, p. 689–695, 2001.

SHER, L. Alcohol consumption and suicide. **Q J M: An International Journal of Medicine**, v. 99, p. 57–61, 2006.

SIES, H.; STAHL, W. Non-nutritive bioactive constituents of plants: lycopene, lutein and zeaxanthin. **Internation Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 73, p. 95–100, 2003.

SILER-MARSIGLIO, K. I.; SHAW, G.; HEATON, M. B. Pycnogenol® and Vitamin E Inhibit Ethanol-Induced Apoptosis in Rat Cerebellar Granule Cells. **Journal of Neurobiology**, v. 59, p. 261-271, 2004.

SIRCAR, R.; SIRCAR, D. Adolescent rats exposed to repeated ethanol treatment show lingering behavioral impairments. **Alcohol: Clinical and Experimental Research**, v. 29, p. 1402–1410, 2005.

SIU, S. T.; UDALTSOVA, N.; IRIBARREN, C.; KLATSKY, A. L.; STANTON, T.; SIU, M. Alcohol and lung airways function. **The Permanente Journal**, v. 14, p. 11–18, 2010.

SLATTERY, M. L.; BENSON, J.; CURTIN, K.; MA, K. N.; SCHAEFFER, D.; POTTER, J.D. Carotenoids and colon cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 575–582, 2000.

SPONG, C. Y.; ABEBE, D. T.; GOZES, I.; BRENNEMAN, D. E.; HILL, J. M. Prevention of fetal demise and growth restriction in a mouse model of fetal alcohol syndrome. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, p. 774–779, 2001.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memória: da mente às moléculas**. Tradução Dalmaz e Quillfeldt. Porto Alegre: Artmed, 2003.

SQUIRE, L. R.; KNOWLTON, B.; MUSEN, G. The structure and organization of memory. **Annual Review Psychology**, v. 44, p. 453–495, 1993.

SQUIRE, L. R.; ZOLA-MORGAN, S. Memory: Brain systems and behavior. **Trends Neuroscience**, v. 11, p. 170–175, 1988.

SQUIRE, L. R.; ZOLA-MORGAN, S. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 13515–13522, 1996.

STAHRE, M.; ROEBER, J.; KANNY, D.; BREWER, R. D.; ZHANG, X. Contribution of excessive alcohol consumption to deaths and years of potential life lost in the United States. **Preventing Chronic Disease**, v. 11, 2014.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1790, p. 1478–85, 2009.

STEPHENS, D. N.; DUKA, T. Cognitive and emotional consequences of binge drinking: role of amygdala and prefrontal cortex. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences**, v. 363, p. 3169–3179, 2008.

STICKGOLD, R. Sleep-dependent memory consolidation. **Nature**, v. 437, p. 1272–1278, 2005.

SUBCZYNSKI, W. K.; WISNIEWSKA, A.; WIDOMSKA, J. Location of macular xanthophylls in the most vulnerable regions of photoreceptor outer-segment membranes. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 504, p. 61–66, 2010.

SULLIVAN, E. V.; PFEFFERBAUM, A. Neurocircuitry in alcoholism: A substrate of disruption and repair. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 180, p. 583–594, 2005.

SUMANTRAN, V. N.; ZHANG, R.; LEE, D. S.; WICHA, M. S. Differential regulation of apoptosis in normal versus transformed mammary epithelium by lutein and retinoic acid. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 9, p. 257–263, 2000.

THINUS-BLANC, C. **Animal Spatial Cognition Behavioural and Brain Approaches**. Singapore: World Scientific, 1996.

THURNHAM, P. A.; SCHALCK, W.; AEBISCHER, J. C.; TENTER, U.; COHN, W. Plasma kinetics of lutein, zeaxanthin and 3'-dehydro-lutein after multiple oral doses of

a lutein supplement. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, p. 88–97, 2000.

TREVITHICK, J. R.; TREVITHICK-SUTTON, C. C.; DZIALOSZYNSKI, T.; M. COLLINS; KOLENKO, M.; AJAMI, Z. Radical scavenging by lutein and related carotenoids may contribute to risk reduction of AMD and cataract. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 46, p. 3855, 2005.

TRUSHINA, E.; MCMURRAY, C. T. “Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases,” **Neuroscience**, v. 145, p. 1233–1248, 2007.

TULVING, E. **Elements of episodic memory**. Oxford: Clarendon Press, 1983.

ULLAH, N.; NASEER, M. I.; ULLAH, I.; LEE, H. Y.; KOH, P. O.; KIM, M. O. Protective effect of pyruvate against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. **Neuropharmacology**, v. 61, p. 1248-1255, 2011.

UNIVERSITY OF BRISTOL. Centre for Synaptic Plasticity. Disponível em: <[www.bristol.ac.uk/synaptic/pathways/](http://www.bristol.ac.uk/synaptic/pathways/)>.

VALLÉS, S. L.; BLANCO, A. M.; PASCUAL, M.; GUERRI, C. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. **Brain Pathology**, v. 14, p. 365–371, 2004.

VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; MOLANDER, A.; SPANAGEL, R. Neuropharmacology of alcohol addiction. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, p. 299–315, 2008.

VISHWANATHAN, R.; IANNACCONE A.; SCOTT, T. M.; KRITCHEVSKY, S. B.; JENNINGS, B. J.; CARBONI, G.; FORMA, G.; SATTERFIELD, S.; HARRIS, T.; JOHNSON, K. C.; SCHALCH, W.; RENZI, L. M.; ROSANO, C.; JOHNSON, E. J. Macular pigment optical density is related to cognitive function in older people. **Age and Ageing**, v. 43, p. 271-275, 2014a.

VISHWANATHAN R.; KUCHAN, M. J.; SEN, S.; JOHNSON, E. J. Lutein is the Predominant Carotenoid in Infant Brain: Preterm Infants Have Decreased Concentrations of Brain Carotenoids. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 59, p. 659 – 665, 2014b.

VISHWANATHAN, R.; NEURINGER, M.; SNODDERLY, D. M.; SCHALCH, W.; JOHNSON, E. J. Macular lutein and zeaxanthin are related to brain lutein and zeaxanthin in primates. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, p. 1 – 29, 2013.

VISIOLI, F.; KEANEY, J. F.; HALLIWELL, B.; Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 409, 2000.

WAGNER, A. D.; SCHACTER, D. L.; ROTTE, M.; KOUTSTAAL, W.; MARIL, A.; DALE, A. M.; ROSEN, B. R.; BUCKNER, R. L. Building memories: Remembering and forgetting of verbal experiences as predicted by brain activity. **Science**, v. 281, p. 1188–1191, 1998.

WANG, M. X.; JIAO, J. H.; LI, Z. Y.; LIU, R. R.; SHI, Q.; MA, L. Lutein supplementation reduces plasma lipid peroxidation and C-reactive protein in healthy nonsmokers. **Atherosclerosis**, v. 227, p. 380-385, 2013.

WANG, W.; SHINTO, L.; CONNOR, W. E.; QUINN, J. F. Nutritional biomarkers in Alzheimer's disease: the association between carotenoids, n-3 fatty acids, and dementia severity. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 13, p. 31–38, 2008.

WANG, M.; TSAO, R.; ZHANG, S.; DONG, Z.; YANG, R.; GONG, J.; PEI, Y. Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1522–1529, 2006.

WANNAMETHEE, S. G.; SHAPER, A. G.; PERRY, I. J.; ALBERTI, K. G. M. M. Alcohol consumption and the incidence of type II diabetes. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 56, p. 542–548, 2002.

WATTS, J.; THOMSON, A. M. Excitatory and inhibitory connections show selectivity in the neocortex. **The Journal of Physiology**, v. 562.1, p. 89–97, 2005.

WILLIAMS, C. A.; KRONFELD, D. S.; HESS, T. M.; SAKER, K. E.; WALDRON, J. N.; CRANDELL, K. M.; HOFFMAN, R. M.; HARRIS, P. A. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80km endurance race. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 588-594, 2004.

WIXTED, J. T. The psychology and neuroscience of forgetting. **Annual Review Psychology**, v. 55, p. 235–269, 2004.

WRIGHT, J. W.; MASINO, A. J.; REICHERT, J. R.; TURNER, G. D.; MEIGHAN, S. E.; MEIGHAN, P. C.; HARDING, J. W. Ethanol-induced impairment of spatial memory and brain matrix metalloproteinases. **Brain Research**, v. 963, p. 252–261, 2003.

WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. **Alcohol Research and Health**, v. 27, p. 277-284, 2003.

WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Oxidative stress and alcoholic liver disease. **Seminars in Liver Disease**, v. 29, p. 141-154, 2009.

YANG, J-Y.; XUE, X.; TIAN, H.; WANG, X-X.; DONG, Y-X.; WANG, F.; ZHAO, Y. N.; YAO, X. C.; CUI, W.; WU, C. F. Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease: Pathological and behavioral dysfunction at different developmental stages. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 144, p. 321-337, 2014.

YEUM, K. J.; RUSSELL, R. M. Carotenoid bioavailability and bioconversion. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 483- 504, 2002.

YIN, S.-J.; LIAO, C.-S.; CHEN, C.-M.; FAN, F.-T.; LEE, S.-C. Genetic polymorphism and activities of human lung alcohol and aldehyde dehydrogenases: implications for

ethanol metabolism and cytotoxicity. **Biochemical Genetics**, v. 30, p. 203–215, 1992.

YONELINAS, A. P. The nature of recollection and familiarity: a review of 30 years of research. **Journal of Memory Language**, v. 46, p. 441–517, 2002.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 385, p. 20–7, 2001.

ZHAO, X.; ALDINI, G.; JOHNSON, R. J.; RASMUSSEN, H.; KRAEMER, K.; WOOLF, H.; MUSAEUS, N.; KRINSKY, N. I.; RUSSELL, R. M.; YEUM, K. J. Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 163-9, 2006.

ZHAO, Y-N.; WANG, F.; FAN, Y-X.; PING, G-F.; YANG, J-Y.; WU, C-F. Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. **Behavioural Brain Research**, v. 236, p. 270–282, 2013.

ZHONG, S. Z.; GE, Q. H.; QU, R.; LI, Q.; MA, S. P. Paeonol attenuates neurotoxicity and ameliorates cognitive impairment induced by D-galactose in ICR mice. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 277, p. 58–64, 2009.

ZORUMSKI, C. F.; MENNERICK, S.; IZUMI, Y. Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. **Alcohol**, v. 48, p. 1–17, 2014.


ZOU, J.; CREWS, F. Induction of innate immune gene expression cascades in brain slice cultures by ethanol: key role of NF-kappaB and proinflammatory cytokines. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 34, p. 777–789, 2010.

ZOU, J. Y.; MARTINEZ, D. B.; NEAFSEY, E. J.; COLLINS, M. A. Binge ethanol induced brain damage in rats: Effect of inhibitors of nitric oxide synthase. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 20, p. 1406 –1411, 1996.

ZOETHOUT, R. W.; DELGADO, W. L.; IPPEL, A. E.; DAHAN, A.; VAN GERVEN, J. M. Functional biomarkers for the acute effects of alcohol on the central nervous system in healthy volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, p. 331–350, 2011.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Manuscrito submetido para “Food and Chemical Toxicology”

**Food and Chemical Toxicology** Contact us Help ?  ['My EES Hub' available for consolidated users ... more](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) Username: [petriguerra@gmail.com](mailto:petriguerra@gmail.com)  
Switch To: [Author](#) Go to: [My EES Hub](#) Version: [EES 2016.3](#)

**Submissions Being Processed for Author Gustavo Petri Guerra**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submission</a>		Lutein prevents ethanol-induced memory deficit in rats	Apr 18, 2016	Apr 18, 2016	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

## Lutein prevents ethanol-induced memory deficit in rats

Júlia Maria Tonin Geiss<sup>a</sup>; Sara Sagae<sup>b</sup>; Maria Lúcia Bonfler<sup>b</sup>; Luciana Oliveira de Fariña<sup>c</sup>; Edson Duarte Ribeiro Paz<sup>b</sup>; Mayara Lutchemeyer de Freitas<sup>d</sup>; Naiéli Schiefelbein Souto<sup>e</sup>; Ana Flavia Furian<sup>d,e</sup>; Mauro Schneider Oliveira<sup>d</sup>; Gustavo Petri Guerra<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, PR, 85884-000, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Fisiologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, 85819-110, Brazil

<sup>c</sup>Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, 85819-110, Brazil

<sup>d</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>e</sup>Programa de Pós-graduação em Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

\*Corresponding author. Address: Department of Food, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, PR, 85884-000, Brazil. Tel: +55 45 3240 8091

E-mail adress: petriguerra@gmail.com (G.P. Guerra)

*Abbreviations:* CAT, catalase; DTNB, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid); GPx, Glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; MDA, malondialdehyde; 3-NP, 3-



nitropropionic acid; NPSH, Non protein thiol; SDS, sodium dodecyl sulfate; SOD, Superoxide dismutase; TCA, Trichloroacetic acid; TBA, Thiobarbituric acid; TBARS, Thiobarbituric acid reactive substance.

## **Abstract**

Excessive consumption of alcohol affects the central nervous system, resulting in memory and learning deficits. Accordingly, lutein, a carotenoid, known for its antioxidant properties, is believed to be able to prevent neurodegenerative diseases and cognitive deficits. In the present study, we evaluated the effect of lutein on ethanol-induced memory deficits in the object recognition task in adult rats, as well as the possible involvement of oxidative stress. The oral administration of lutein (50 mg/kg) for 14 days prevented ethanol-induced memory deficit in the object recognition task. Furthermore, the administration of lutein, ethanol, and a co-administration of lutein and ethanol did not alter the parameters of oxidative stress (superoxide dismutase, thiobarbituric acid reactive substances, and non-protein thiol), evaluated in the cortex and hippocampus. These results suggest that lutein is an alternative treatment for ethanol-induced memory deficits, however, the mechanism involved in this effect remains uncertain.

**Keywords:** memory; carotenoids; object recognition; alcohol; oxidative stress.

## 1. Introduction

Alcohol is one of the most used drugs in the world, with 90% of people consuming it at some point in their lives, and of these, approximately 30% develop some type of disorder (Sher, 2006). Excessive alcohol consumption affects many body systems, including the brain and the central nervous system (Heffernan, 2008; Zorumski et al., 2014), which may cause cognitive, learning, and short- or long-term memory deficits (Pascual et al., 2007; Sircar and Sircar, 2005).

In fact, it has been shown that brain damages and memory deficits are related to alcohol consumption in humans (Beresford et al., 2006; Järvenpää et al., 2005; Sullivan and Pfefferbaum, 2005; Sullivan et al., 2000a, 2000b) and in animals (Cacace et al., 2011; Cain et al., 2002; Obernier et al., 2002; Pascual et al., 2007; Robinson et al., 2012). A recent study shows there is significant spatial and non-spatial memory impairment in rats treated with intermittent ethanol exposure (Zhao et al., 2013).

Furthermore, acute or chronic ethanol exposure increases the production of reactive species and decreases the antioxidant defenses (Calabrese et al., 2000; Wu and Cederbaum, 2003). Ethanol inhalation (1.6 g/kg) for 12 weeks (Das and Mukherjee, 2010) or acute oral administration (70%, 2 mL/kg) (Ibrahim et al., 2012) increases lipid peroxidation and induces a significant reduction in antioxidant enzyme activity, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) (Das and Mukherjee, 2010; Ibrahim et al., 2012).

Considering that there has been an increase in the prevalence of alcohol consumption over the last few years, it is important to prevent alcohol-related disorders that can impair daily activities as well as productivity in work or studies.

Therefore, studies that contribute to the development of treatments and new therapeutic options able to prevent, reduce or eliminate ethanol-induced memory deficits, whilst being effective, safe, inexpensive, and with no side effects, are of extreme importance. In this sense, growing evidence to support the important role of bioactive compounds, extra nutritional constituents present mainly in food of plant origin, that act in maintaining health and cause a reduction in the risk of disease, without side effects (Espín et al., 2007; Kussmann et al., 2007; Rein et al., 2013).

Bioactive compounds such as carotenoids, vitamins B, C, D and E, flavonoids, polyunsaturated fatty acids, curcumin, and piperine are being studied as alternative for the treatment of cancer, neurodegenerative, and cardiovascular diseases (Gillette-Guyonnet et al., 2013; Gunasekera et al., 2007; Gutierrez et al., 2014; Joseph et al., 2009; Kaur et al., 2011; Lim et al., 2001; Mi et al., 2013; Nagao, 2009; Obulesu et al., 2011; Sunila and Kuttan, 2004; Vijayakumar et al., 2004).

Lutein is xanthophyll carotenoid known for its antioxidant properties, with the ability to remove free radicals and consequently prevent damage to lipoproteins, membrane lipids, proteins, and DNA, thereby preventing oxidative stress (Kim et al., 2008; Ozawa et al., 2012; Trevithick et al., 2005; Wang et al., 2006, 2013).

There are lines of evidence supporting the role of lutein in cognitive processes and neurodegenerative diseases. Firstly, supplementation or a diet consumption rich in lutein sources are associated with low rates of cognitive decline due to aging (Johnson, 2012; Johnson et al., 2008; Kang et al., 2005; Kesse-Guyot et al., 2014). In accordance with this view, the oral administration of lutein (50 or 100 mg/kg) has been described to improve the cognitive deficits caused by Huntington's disease (Binawade and Jagtap, 2013). Secondly, lutein is the main carotenoid found in the human brain, forming approximately 30% of the total carotenoids concentration. It

displays an ability to cross the blood–brain barrier, with preferential uptake compared to most other carotenoids, showing a positive correlation between the serum and brain levels of lutein (Craft et al., 2004; Johnson et al., 2013; Vishwanathan et al., 2014). Moreover, lutein accumulation in the macula is associated with the levels present in the brain regions such as the cerebellum, frontal, and occipital cortex (Vishwanathan et al., 2015, 2014, 2013). Thirdly, an improvement in cognitive function has been associated with increased levels of lutein in the serum and brain (Johnson et al., 2013; Keller et al., 2005). Furthermore, the increase in macular pigment optical density is positively correlated with cognitive function in the elderly (Kelly et al., 2015; Vishwanathan et al., 2013). Fourthly, individuals with mild cognitive deficit (Akbaraly et al., 2007; Johnson et al., 2013; Rinaldi et al., 2003) or Alzheimer’s disease (Dias et al., 2014; Kiko et al., 2012; Rinaldi et al., 2003; Wang et al., 2008) have reduced levels of lutein in the plasma and brain as compared with normal individuals. Furthermore, the low macular pigment optical density is associated with a lower cognitive performance in the elderly (Feeney et al., 2013; Renzi et al., 2014).

Therefore, considering the confluent results that support the role of lutein in cognitive functions and the prevention of degenerative diseases (Akbaraly et al., 2007; Dias et al., 2014; Johnson, 2012; Johnson et al., 2013, 2008; Kang et al., 2005; Kesse-Guyot et al., 2014; Kiko et al., 2012; Mulder et al., 2014; Rinaldi et al., 2003), in the present study, we investigated whether lutein prevented ethanol-induced memory deficit as well as the possible mechanisms of its action.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals and reagents

All experimental protocols were designed with the aim of keeping the number of animals used to a minimum as well as their suffering. These protocols were conducted in accordance with National and International legislation [guidelines of the Brazilian Council of Animal Experimentation (CONCEA) and of the U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals (PHS Policy)], and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Estadual do Oeste do Paraná (01/2016). Male Wistar rats (weight: 250–300 g; n = 182) were bred in the Animal House of the Universidade Estadual do Oeste do Paraná, housed 5 to a cage, and maintained on a natural day/night cycle, at 21 °C with access to water and rodent laboratory chow (Algomix, Ouro Verde do Oeste, PR, Brazil) *ad libitum*. Behavioral tests were conducted during the light phase of the cycle (from 9:00 a.m. to 5:00 p.m.). Lutein (12%) was obtained from a local supplier and dissolved in olive oil, immediately before administration. Ethanol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and diluted in saline (0.9% NaCl). All the other reagents used were of analytical grade and purchased from local suppliers.

### 2.2. Object Recognition Task

The object recognition task was performed to evaluate the declarative memory, according to Bevins and Besheer (2006), with minor modifications. The task was performed in a wooden chamber (60 × 40 × 30 cm), with black painted walls, the front wall consisting of clear Plexiglas, and the floor covered with an ethyl vinyl

acetate sheet. A light bulb, hanging 60 cm above the behavioral apparatus, provided constant illumination of approximately 40 lux, and an air-conditioner provided constant background sound isolation. The objects used were pairs of plastic mounting bricks, with each pair composed of different shapes (rectangular, pyramid, and stair-like shapes), and colors (white, red, and blue), but all of the same size. Throughout the experiments, the objects were used in a counterbalanced manner, and the rats did not previously display a preference for any of the objects. Chambers and objects were cleaned after each subject was tested with 30 % ethanol. The task consisted of habituation, training, and testing sessions; each of them with the duration of 10 min. In the first session, rats were habituated to the behavioral apparatus and then returned to their home cage. In this session, the number of crossing and rearing responses were recorded to identify any motor disabilities, which might influence the performance of the task. For this evaluation, the wooden chamber had the floor divided into 12 squares. Twenty-four hours later, the training session occurred, where rats were exposed to two of the same objects (Object A), and the exploration time was recorded with two stopwatches. Exploration was recorded when the rat touched or reached the object with the nose, at a distance of less than 2 cm. Climbing or sitting on the object was not considered exploration. The test session was carried out 24 h after the training session. Each rat was placed back in the behavioral chamber and one of the already known objects (Object A) was replaced by a novel object (Object B). The times spent exploring the already known and novel objects were recorded. The discrimination index was then calculated, taking into account the difference of time spent exploring the novel (B) and already known (A) object  $\times 100$  divided by the sum of time spent exploring the novel (B) and

already known (A), and used as a cognitive parameter  $\{[T \text{ novel (B)} - T \text{ already known (A)}] / T \text{ novel (B)} + T \text{ already known (A)}\} \times 100$ .

### 2.3. Measurement of oxidative stress indicators

#### 2.3.1. Preparation of tissues

Immediately after the test session of the novel object recognition task, the rats were euthanized, the hippocampus and cerebral cortex were removed, weighed, and homogenized in Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) buffer; the resulting homogenate was then centrifuged at 10,000 rpm x 10 min at 4 °C for the determination of enzymatic and non-enzymatic indicators of oxidative stress.

The protein content was measured colorimetrically using the Bradford method (1976), and bovine serum albumin (1 mg/mL) was used as the standard.

#### 2.3.2. Superoxide dismutase (SOD) activity

The activity of SOD was determined according to the method described by Misra and Fridovich (1972). This method is based on the ability of SOD to inhibit the autoxidation of adrenaline to adrenochrome. In summary, the supernatant fraction (20–60 µL) was added to a medium containing glycine buffer (50 mM, pH 11) and adrenaline (1 mM). The kinetic analysis of SOD was started after adrenaline addition, at 38 °C, and the color reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 38 °C, and the results were expressed as units (U)/mg of protein.

### 2.3.3. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) determination

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS and was expressed in terms of the malondialdehyde (MDA) content, according to the method described by Ohkawa et al. (1979). In this method, MDA, an end product of fatty acid peroxidation, reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a colored complex. The content of TBARS was measured in a medium containing 100  $\mu$ L of tissue homogenate of the hippocampus or of the cerebral cortex; 15  $\mu$ L of 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 60  $\mu$ L of acetic acid buffer (2.5 M, pH 3.4), and 115  $\mu$ L of 0.81% TBA. The mixture was then heated at 95 °C for 120 min in a water bath. After cooling to room temperature, absorbance was measured in the supernatant at 532 nm. The results were calculated as  $\mu$ mol MDA/mg of protein.

### 2.3.4. Non protein thiol (NPSH)

NPSH levels were determined according to the method described by Ellman et al. (1959) with some modifications. Samples were precipitated with trichloroacetic acid (TCA, 10%) and subsequently centrifuged at 3,000 x g for 10 min. After the centrifugation, the supernatant fraction (60  $\mu$ L) was added to a reaction medium containing potassium phosphate buffer (1 M, pH 7.4) and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB, 10 mM). The NPSH levels were measured spectrophotometrically at 412 nm. The results were calculated using a standard curve constructed with reduced glutathione (GSH) and corrected based on the protein content. The results were calculated as nmol NPSH/mg of protein.

## 2.4. Experimental design



#### 2.4.1. Experiment 1: Effect of lutein on object recognition task performance

A dose–response curve for lutein was performed to evaluate the effect on object recognition task performance and to define the dose for the subsequent experiments. The rats were weighed and randomly divided into two groups receiving lutein (15, 50 and 100 mg/kg) or olive oil (1 mL/kg) by oral gavage, once daily for 14 days. On day 15, the rats were evaluated on the object recognition task. The dose range was selected based on previous study which show that lutein (50 mg/kg) improves deficits induced by Huntington’s disease (Binawade and Jagtap, 2013). The treatment schedule is depicted in Figure 1.

#### 2.4.2. Experiment 2: Effect of sub-chronic ethanol administration on object recognition task performance

A dose–response curve for ethanol was performed to define the dose that induce memory deficit for the subsequent experiments. The rats were weighed and randomly divided into two groups receiving ethanol (0.3, 1 or 3 g/kg) or saline (0.9 % NaCl, 10 mL/kg) by oral gavage, once daily for 7 days. On day 8, the rats were evaluated on the object recognition task. The dose range was selected based on previous study which show that ethanol administration (2 or 3.4 g/kg) cause memory deficit (Gomez et al., 2013; Kuzmin et al., 2013). The treatment schedule is depicted in Figure 2.

#### 2.4.3. Experiment 3: Effect of lutein on memory deficit and oxidative stress indicators induced by sub-chronic ethanol administration

Once it had been determined that lutein at the dose of 50 mg/kg did not alter memory *per se* and ethanol (3 g/kg) induced a memory deficit, we tested whether this dose of lutein prevented the memory deficits induced by sub-chronic ethanol administration. The rats were randomly divided into two groups receiving lutein (50 mg/kg) or olive oil (1 mL/kg) by oral gavage once daily for 14 days. On day 8 each group was again randomly divided into two groups receiving either ethanol (3 g/kg) or saline (0.9 % NaCl, 10 mL/kg) by oral gavage once daily for 7 days. It is, therefore, lutein administered along with ethanol. On day 15, each rat was evaluated on the object recognition task, and then, the hippocampus and cerebral cortex were removed for the determination of oxidative stress indicators (SOD, TBARS and NPSH). The treatment schedule is depicted in Figure 3.

## 2.5. Statistical analysis

GraphPad Prism 5 Software was used for statistical analysis and plotting graphs. Statistical analyses were performed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's post hoc test, depending on the experiment. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. All data are expressed as the mean and S.E.M.

## 3. Results

### 3.1. Experiment 1

Figure 4 shows the effect of the oral administration of lutein (15–100 mg/kg) for 14 days, on the discrimination index in the test session of the object recognition task. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that lutein, at the dose of 100 mg/kg, significantly increased the discrimination index [ $F_{(3,34)} = 7.13$ ;  $p < 0.05$ ], revealing that lutein administration improved memory in the object recognition task. There was no significant difference between the groups for the time spent exploring both objects in the training session, thus indicating no biased exploration of objects (data not shown). Table 1 shows the effect of lutein on the exploratory behavior of rats, during the habituation session in the object recognition task. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that lutein did not alter the number of crossing or rearing responses (F values shown in Table 1), suggesting that its administration did not cause gross motor disabilities during training and testing sessions. The dose of lutein used in the subsequent experiments (50 mg/kg) was selected based on the lack of effect on memory shown in this experiment.

### 3.2. Experiment 2

Figure 5 shows the effect of sub-chronic oral administration of ethanol (0.3–3 g/kg) for 7 days on the discrimination index in the test session of the object recognition task. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that ethanol, at the dose of 3 g/kg, significantly decreased the discrimination index [ $F_{(3,37)} = 3.06$ ;  $p < 0.05$ ], revealing that ethanol administration impaired memory in the object recognition task. There was no significant difference between the groups for the time spent exploring both objects in the training session, indicating no biased exploration of objects (data not shown). Table 2 shows the effect of ethanol on the exploratory

behavior of rats, during the habituation session of the object recognition task. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that ethanol did not alter the number of crossing or rearing responses (F values shown in Table 2), suggesting that its administration did not cause gross motor disabilities during training and testing sessions. The dose of ethanol used in the subsequent experiments (3 g/kg) was selected due induce memory deficit in this experiment.

### 3.3. Experiment 3

Figures 6, 7 and 8 show the effect of the oral administration of lutein (50 mg/kg), ethanol (3 g/kg), and the co-administration of ethanol and lutein on the discrimination index in the test session of the object recognition task, and on oxidative stress indicators (SOD, TBARS and NPSH) in the hippocampus and cerebral cortex. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant lutein or olive oil versus ethanol or saline interaction [ $F_{(3,39)} = 7.64$ ;  $p < 0.05$ ], revealing that lutein co-administration prevented the ethanol-induce memory deficit in the object recognition task (Fig. 6). There was no significant difference between groups for the time spent exploring both objects in the training session, indicating no biased exploration of objects (data not shown). Statistical analysis also revealed that the administration of lutein, ethanol and the co-administration of ethanol and lutein did not alter the levels of SOD, TBARS and NPSH in the hippocampus (Fig. 7 A, B and C) and the cerebral cortex of rats (Fig. 8 A, B and C). Table 3 shows the effect of the oral administration of lutein, ethanol and co-administration of ethanol and lutein on exploratory behavior of the rats, during the habituation session of the object recognition task. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed that pharmacological

treatments did not alter the number of crossing or rearing responses (F values shown in Table 3), suggesting that none of the compounds tested caused gross motor disabilities during training and testing sessions.

#### **4. Discussion**

In this study, we showed that lutein, a xanthophyll with antioxidant properties, improved memory *per se*, but mainly that, this carotenoid prevented the ethanol-induced memory deficit in the object recognition task. Furthermore, we showed that administration of lutein and the co-administration of ethanol and lutein did not alter oxidative stress indicators, such as SOD, TBARS and NPSH in the hippocampus (Fig. 7) and the cerebral cortex (Fig. 8). Surprisingly, the results indicated that neither of the ethanol administration showed any effect on oxidative stress indicators.

Our results are consistent with those of previous studies, which demonstrated the effect of lutein supplementation *per se*. In this sense, supplementation of lutein increases processing speed in young healthy subjects (Bovier and Hammond, 2015) and improve verbal fluency in older healthy women (Johnson et al., 2008). In contrast, lutein administration *per se*, for 14 days, does not alter significantly the memory and cognitive performance of rats evaluated in the water maze and elevated plus maze tasks (Binawade and Jagtap, 2013).

However, numerous studies have shown the protective effect of lutein, mainly from cognitive deficits in the elderly or caused by age-related diseases (Johnson, 2012; Johnson et al., 2008; Kang et al., 2005; Kesse-Guyot et al., 2014; Nolan et al., 2015; Renzi et al., 2014). Little is known about the effects of lutein on the prevention or reversal of memory deficit not caused by aging (Binawade and Jagtap, 2013; Muriach et al., 2006), which occurs with alcohol consumption. Learning and memory

deficits can occur from different forms of alcohol exposure, such as acute (Novier et al., 2013; Ryabinin et al., 2002), sub-chronic (Cippitelli et al., 2010a, 2010b; Kuzmin et al., 2012) or chronic (Farr et al., 2005; García-Moreno and Cimadevilla, 2012).

In support of this view, the protective effects of lutein on deficits not attributed to aging have been demonstrated in a number of studies. The treatment of lutein (50 or 100 mg/kg), for 14 days, prevents 3-nitropropionic acid-induced memory impairment (3-NP), in an animal model of Huntington's disease, in the water maze and in the elevated plus maze tasks (Binawade and Jagtap, 2013). In addition, the administration of lutein (0.2 mg/kg) for 10 days prevents the deleterious effects of diabetes in the retina and the hippocampus of rats (Muriach et al., 2006).

Furthermore, carotenoids can be used to treat many aspects of underlying pathology, such as oxidative stress (Wang et al., 2013). In this context, lutein has no effect *per se* on some oxidative parameters, however, it suggests that antioxidant action and the ability to combat oxidative stress are responsible for the protective effect on dysfunctions and deficits caused by different factors, such as diabetes, 3-NP, ischemic stroke or alcohol (Arnal et al., 2010, 2009; Binawade and Jagtap, 2013; Du et al., 2015; Li et al., 2012; Muriach et al., 2006).

Regarding this point, ethanol administration leads to increased oxidative stress, due to a decrease in antioxidant enzyme activity (Das and Mukherjee 2010; Ibrahim et al. 2012; Reddy et al. 1999; Skrzydlewska et al. 2005). In contrast, there are also some conflicting results (Boveris et al., 1997; Gönenç et al., 2005; Somani et al., 1996). The administration of ethanol (2.5 g/kg) for 4 days increases the level of TBARS and does not alter the activity of SOD and GPx in the hippocampus, whereas in the cortex, the activity of antioxidant enzymes and level of TBARS are not modified (Gönenç et al., 2005). In addition, the administration of ethanol (4 g/kg; single dose)

does not alter the antioxidant enzyme activity, such as SOD, CAT and GPx in the rat brain (Boveris et al., 1997). Similarly, the chronic consumption of ethanol (5% w/v) for 2 months, does not alter the activity of SOD in the cerebellum (Xia et al., 1999). Furthermore, ethanol (1.6 g/kg) increases the MDA levels and SOD activity in the cortex, as well as the CAT and GPx activity in the striatum (Somani et al., 1996). Moreover, the administration of ethanol (4.5 g/kg) for 14 days prenatal and 21 days postnatal does not alter the SOD and CAT activity in the hippocampus and cerebellum, respectively (Shirpoor et al., 2009). This discrepancy in the results can be explained by variations in the adopted experimental protocols, such as the use of different animals or doses.

Due to the lack of the effect of ethanol on the oxidative stress indicators, it was not possible to evaluate whether lutein played a protective role on the oxidative damage caused by ethanol. However, ethanol administration caused a memory deficit in the object recognition task and treatment with lutein was able to prevent this deficit.

In summary, our results support the fact that lutein prevents ethanol-induced memory deficit but that such an effect does not involve oxidative stress or antioxidant systems in the cortex and hippocampus of rats. Although we do not have experimental evidence, it is possible that the effect of lutein on memory deficit involves an alternative mechanism to the antioxidant. These currently reported results support lutein as a therapeutic target for the development of drugs able to prevent ethanol-induced memory deficits, thus allowing the identification of effective pharmacological strategies for treatment.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Acknowledgments**

This study was supported by CNPq (306469/2005-0). J.M.T. Geiss, N.S. Souto and M.L. de Freitas are the recipient of a CAPES fellowship. A.F. Furian and M.S. Oliveira are the recipient of a CNPq fellowship. All of the experiments comply with the current laws of Brazil.

### **References**

- Akbaraly, N.T., Faure, H., Gourlet, V., Favier, A., Berr, C., 2007. Plasma carotenoid levels and cognitive performance in an elderly population: results of the EVA Study. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 62, 308–316.
- Arnal, E., Miranda, M., Barcia, J., Bosch-Morell, F., Romero, F.J., 2010. Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. *Neuroscience* 166, 271–278. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.028
- Arnal, E., Miranda, M., Johnsen-Soriano, S., Alvarez-Nolting, R., Diaz-Llopis, M., Araiz, J., Cervera, E., Bosch-Morell, F., Romero, F.J., 2009. Beneficial effect of docosahexanoic acid and lutein on retinal structural, metabolic, and functional abnormalities in diabetic rats. *Curr. Eye Res.* 34, 928–938. doi:10.3109/02713680903205238
- Beresford, T.P., Arciniegas, D.B., Alfors, J., Clapp, L., Martin, B., Du, Y., Liu, D., Shen, D., Davatzikos, C., 2006. Hippocampus Volume Loss Due to Chronic



- Heavy Drinking. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 1866–1870. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00223.x
- Bevins, R.A., Besheer, J., 2006. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory. *Nat. Protoc.* 1, 1306–1311. doi:10.1038/nprot.2006.205
- Binawade, Y., Jagtap, A., 2013. Neuroprotective effect of lutein against 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like symptoms: possible behavioral, biochemical, and cellular alterations. *J. Med. Food* 16, 934–943. doi:10.1089/jmf.2012.2698
- Boveris, A., Llesuy, S., Azzalis, L.A., Giavarotti, L., Simon, K.A., Junqueira, V.B., Porta, E.A., Videla, L.A., Lissi, E.A., 1997. In situ rat brain and liver spontaneous chemiluminescence after acute ethanol intake. *Toxicol. Lett.* 93, 23–28. doi:S0378427497000660 [pii]
- Bovier, E.R., Hammond, B.R., 2015. A randomized placebo-controlled study on the effects of lutein and zeaxanthin on visual processing speed in young healthy subjects. *Arch. Biochem. Biophys.* 572, 54–57.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Cacace, S., Plescia, F., La Barbera, M., Cannizzaro, C., 2011. Evaluation of chronic alcohol self-administration by a 3-bottle choice paradigm in adult male rats. Effects on behavioural reactivity, spatial learning and reference memory. *Behav. Brain Res.* 219, 213–220. doi:10.1016/j.bbr.2011.01.004

- Cain, D.P., Finlayson, C., Boon, F., Beiko, J., 2002. Ethanol impairs behavioral strategy use in naive rats but does not prevent spatial learning in the water maze in pretrained rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 164, 1–9. doi:10.1007/s00213-002-1182-3
- Calabrese, V., Testa, G., Ravagna, A., Bates, T.E., Stella, A.M., 2000. HSP70 induction in the brain following ethanol administration in the rat: regulation by glutathione redox state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1006/bbrc.2000.2311
- Cippitelli, A., Damadzic, R., Frankola, K., Goldstein, A., Thorsell, A., Singley, E., Eskay, R.L., Heilig, M., 2010a. Alcohol-Induced Neurodegeneration, Suppression of Transforming Growth Factor- $\beta$ , and Cognitive Impairment in Rats: Prevention by Group II Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *Biol. Psychiatry* 67, 823–830. doi:10.1016/j.biopsych.2009.12.018
- Cippitelli, A., Zook, M., Bell, L., Damadzic, R., Eskay, R.L., Schwandt, M., Heilig, M., 2010b. Reversibility of object recognition but not spatial memory impairment following binge-like alcohol exposure in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 94, 538–546. doi:10.1016/j.nlm.2010.09.006
- Craft, N.E., Haitema, T.B., Garnett, K.M., Fitch, K.A., Dorey, C.K., 2004. Carotenoid, tocopherol, and retinol concentrations in elderly human brain. *J. Nutr. Heal. Aging* 8, 156–162.
- Das, S.K., Mukherjee, S., 2010. Long-Term Ethanol Consumption Leadsto Lung Tissue Oxidative Stress and Injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3, 414–420. doi:10.4161/oxim.3.6.14417

- Dias, I.H.K., Polidori, M.C., Lia, L., Weberd, D., Stahlb, W., Nellese, G., Gruned, T., Griffiths, H.R., 2014. Plasma levels of HDL and carotenoids are lower in dementia patients with vascular comorbidities. *J. Alzheimer's Dis. JAD* 40, 399–408. doi:10.3233/JAD-131964.Plasma
- Du, S.-Y., Zhang, Y.-L., Bai, R.-X., Ai, Z.-L., Xie, B.-S., Yang, H.-Y., 2015. Lutein prevents alcohol-induced liver disease in rats by modulating oxidative stress and inflammation. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 8785–8793.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6
- Espín, J.C., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A., 2007. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry* 68, 2986–3008. doi:10.1016/j.phytochem.2007.09.014
- Farr, S.A., Scherrer, J.F., Banks, W.A., Flood, J.F., Morley, J.E., 2005. Chronic ethanol consumption impairs learning and memory after cessation of ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 971–982. doi:10.1097/01.ALC.0000171038.03371.56
- Feeney, J., Finucane, C., Savva, G.M., Cronin, H., Beatty, S., Nolan, J.M., Kenny, R.A., 2013. Low macular pigment optical density is associated with lower cognitive performance in a large, population-based sample of older adults. *Neurobiol. Aging* 34, 2449–2456. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.007
- García-Moreno, L.M., Cimadevilla, J.M., 2012. Acute and chronic ethanol intake: effects on spatial and non-spatial memory in rats. *Alcohol* 46, 757–762. doi:10.1016/j.alcohol.2012.08.001

- Gillette-Guyonnet, S., Secher, M., Vellas, B., 2013. Nutrition and neurodegeneration: epidemiological evidence and challenges for future research. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75, 738–755. doi:10.1111/bcp.12058
- Gomez, J.L., Lewis, M.J., Sebastian, V., Serrano, P., Luine, V.N., 2013. Alcohol Administration Blocks Stress-Induced Impairments in Memory and Anxiety, and Alters Hippocampal Neurotransmitter Receptor Expression in Male Rats. *Horm. Behav.* 63, 659–666.
- Gönenç, S., Uysal, N., Açikgöz, O., Kayatekin, B.M., Sönmez, A., Kiray, M., Aksu, I., Güleçer, B., Topçu, A., Semin, I., 2005. Effects of melatonin on oxidative stress and spatial memory impairment induced by acute ethanol treatment in rats. *Physiol. Res.* 54, 341–348.
- Gunasekera, R.S., Sewgobind, K., Desai, S., Dunn, L., Black, H.S., McKeehan, W.L., Patil, B., 2007. Lycopene and lutein inhibit proliferation in rat prostate carcinoma cells. *Nutr. Cancer* 58, 171–177. doi:10.1080/01635580701328339
- Gutierrez, J.M., Carvalho, F.B., Schetinger, M.R.C., Marisco, P., Agostinho, P., Rodrigues, M., Rubin, M.A., Schmatz, R., Da Silva, C.R., Cognato, G. de P., Farias, J.G., Signor, C., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., Bogo, M., Bonan, C.D., Spanevello, R., 2014. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci.* 96, 7–17. doi:10.1016/j.lfs.2013.11.014
- Heffernan, T.M., 2008. The Impact of Excessive Alcohol Use on Prospective Memory: A Brief Review. *Curr. Drug Abuse Rev.* 1, 36–41.
- Ibrahim, M., Hassan, W., Meinerz, D.F., De Oliveira Leite, G., Nogueira, C.W.,

- Rocha, J.B.T., 2012. Ethanol-induced oxidative stress: The role of binaphthyl diselenide as a potent antioxidant. *Biol. Trace Elem. Res.* 147, 309–314. doi:10.1007/s12011-012-9327-7
- Järvenpää, T., Rinne, J.O., Koskenvuo, M., Räihä, I., Kaprio, J., 2005. Binge drinking in midlife and dementia risk. *Epidemiology* 16, 766–771. doi:10.1097/01.ede.0000181307.30826.6c
- Johnson, E.J., 2012. A possible role for lutein and zeaxanthin in cognitive function in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 96, 1161S–1165S. doi:10.3945/ajcn.112.034611
- Johnson, E.J., McDonald, K., Caldarella, S.M., Chung, H.-Y., Troen, A.M., Snodderly, D.M., 2008. Cognitive findings of an exploratory trial of docosahexaenoic acid and lutein supplementation in older women. *Nutr. Neurosci.* 11, 75–83. doi:10.1179/147683008X301450
- Johnson, E.J., Vishwanathan, R., Johnson, M.A., Hausman, D.B., Davey, A., Scott, T.M., Green, R.C., Miller, L.S., Gearing, M., Woodard, J., Nelson, P.T., Chung, H.-Y., Schalch, W., Wittwer, J., Poon, L.W., 2013. Relationship between Serum and Brain Carotenoids, Tocopherol, and Retinol Concentrations and Cognitive Performance in the Oldest Old from the Georgia Centenarian Study. *J. Aging Res.* 2013, 1–13. doi:10.1155/2013/951786
- Joseph, J., Cole, G., Head, E., Ingram, D., 2009. Nutrition, Brain Aging, and Neurodegeneration. *J. Neurosci.* 29, 12795–12801. doi:10.1523/JNEUROSCI.3520-09.2009
- Kang, J.H., Ascherio, A., Grodstein, F., 2005. Fruit and vegetable consumption and cognitive decline in aging women. *Ann. Neurol.* 57, 713–720.

doi:10.1002/ana.20476

- Kaur, H., Chauhan, S., Sandhir, R., 2011. Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* 36, 1435–1443. doi:10.1007/s11064-011-0469-3
- Keller, J.N., Schmitt, F.A., Scheff, S.W., Ding, Q., Chen, Q., Butterfield, D.A., Markesbery, W.R., 2005. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* 64, 1152–1156. doi:10.1212/01.WNL.0000156156.13641.BA
- Kelly, D., Coen, R.F., Owusu, K., Beatty, S., Dennison, J., Waterford, H., Unit, A.C., 2015. Cognitive Function and Its Relationship with Macular Pigment Optical Density and Serum Concentrations of its Constituent Carotenoids. *J. Alzheimer's Dis.* 48, 261–277. doi:10.3233/JAD-150199
- Kesse-Guyot, E., Andreeva, V.A., Ducros, V., Jeandel, C., Julia, C., Hercberg, S., Galan, P., 2014. Carotenoid-rich dietary patterns during midlife and subsequent cognitive function. *Br. J. Nutr.* 111, 915–923. doi:10.1017/S0007114513003188
- Kiko, T., Nakagawa, K., Tsuduki, T., Suzuki, T., Arai, H., Miyazawa, T., 2012. Significance of lutein in red blood cells of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimer's Dis. JAD* 28, 593–600. doi:10.3233/JAD-2011-111493
- Kim, J.-H., Na, H.-J., Kim, C.-K., Kim, J.-Y., Ha, K.-S., Lee, H., Chung, H.-T., Kwon, H.J., Kwon, Y.-G., Kim, Y.-M., 2008. The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappaB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-kappaB-inducing kinase pathways: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NF-kappaB activation. *Free Radic. Biol. Med.* Med.

45, 885–896. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.019

Kussmann, M., Affolter, M., Nagy, K., Holst, B., Fay, L.B., 2007. Mass spectrometry in nutrition: understanding dietary health effects at the molecular level. *Mass Spectrom. Rev.* 26, 727–750. doi:10.1002/mas

Kuzmin, A., Chefer, V., Bazov, I., Meis, J., Ögren, S.O., Shippenberg, T., Bakalkin, G., 2013. Upregulated dynorphin opioid peptides mediate alcohol-induced learning and memory impairment. *Transl. Psychiatry* 3, e310. doi:10.1038/tp.2013.72

Kuzmin, A., Liljequist, S., Meis, J., Chefer, V., Shippenberg, T., Bakalkin, G., 2012. Repeated moderate-dose ethanol bouts impair cognitive function in Wistar rats. *Addict. Biol.* 17, 132–140. doi:10.1111/j.1369-1600.2010.00224.x.Repeated

Li, S.-Y., Yang, D., Fu, Z.J., Woo, T., Wong, D., Lo, A.C.Y., 2012. Lutein enhances survival and reduces neuronal damage in a mouse model of ischemic stroke. *Neurobiol. Dis.* 45, 624–632. doi:10.1016/j.nbd.2011.10.008

Lim, H.K., Kim, H.S., Choi, H.S., Choi, J., Kim, S.H., Chang, M.J., 2001. Effects of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus* against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Pharmacology* 63, 71–75. doi:56115

Mi, W., van Wijk, N., Cansev, M., Sijben, J.W.C., Kamphuis, P.J., 2013. Nutritional approaches in the risk reduction and management of Alzheimer's disease. *Nutrition* 29, 1080–1089. doi:10.1016/j.nut.2013.01.024

Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247,

3170–3175. doi:4623845

- Mulder, K.A., Innis, S.M., Rasmussen, B.F., Wu, B.T., Richardson, K.J., Hasman, D., 2014. Plasma lutein concentrations are related to dietary intake, but unrelated to dietary saturated fat or cognition in young children. *J. Nutr. Sci.* 3, 1–8. doi:10.1017/jns.2014.10
- Muriach, M., Bosch-Morell, F., Alexander, G., Blomhoff, R., Barcia, J., Arnal, E., Almansa, I., Romero, F.J., Miranda, M., 2006. Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 979–984. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.023
- Nagao, A., 2009. Absorption and function of dietary carotenoids. *Forum Nutr.* 61, 55–63. doi:10.1159/000212738
- Nolan, J.M., Loskutova, E., Howard, A., Mulcahy, R., Moran, R., Stack, J., Bolger, M., Coen, R.F., Dennison, J., Akuffo, K.O., Owens, N., Power, R., Thurnham, D., Beatty, S., 2015. The impact of supplemental macular carotenoids in Alzheimer's disease: a randomized clinical trial. *J. Alzheimers. Dis.* 44, 1157–1169. doi:10.3233/JAD-142265
- Novier, A., Van Skike, C.E., Diaz-Granados, J.L., Mittleman, G., Matthews, D.B., 2013. Acute alcohol produces ataxia and cognitive impairments in aged animals: a comparison between young adult and aged rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 37, 1317–1324. doi:10.1111/acer.12110
- Obernier, J.A., White, A.M., Swartzwelder, H.S., Crews, F.T., 2002. Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 521–532. doi:10.1016/S0091-3057(02)00715-3



- Obulesu, M., Dowlathabad, M.R., Bramhachari, P. V, 2011. Carotenoids and Alzheimer's Disease: An insight into therapeutic role of retinoids in animal models. *Neurochem. Int.* 59, 535–541. doi:10.1016/j.neuint.2011.04.004
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3
- Ozawa, Y., Sasaki, M., Takahashi, N., Kamoshita, M., Miyake, S., Tsubota, K., 2012. Neuroprotective Effects of Lutein in the Retina. *Curr. Pharm. Des.* 18, 51–56.
- Pascual, M., Blanco, A.M., Cauli, O., Miñarro, J., Guerri, C., 2007. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur. J. Neurosci.* 25, 541–550. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05298.x
- Reddy, S.K., Husain, K., Schlorff, E.C., Scott, R.B., Somani, S.M., 1999. Dose response of ethanol ingestion on antioxidant system in rat brain subcellular fractions. *Neurotoxicology* 20, 977–987.
- Rein, M.J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S.K., da Silva Pinto, M., 2013. Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75, 588–602. doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x
- Renzi, L.M., Dengler, M.J., Puente, A., Miller, L.S., Hammond, B.R., 2014. Relationships between macular pigment optical density and cognitive function in unimpaired and mildly cognitively impaired older adults. *Neurobiol. Aging* 35, 1695–1699. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.024

- Rinaldi, P., Polidori, M.C., Metastasio, A., Mariani, E., Mattioli, P., Cherubini, A., Catani, M., Cecchetti, R., Senin, U., Mecocci, P., 2003. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 915–919. doi:10.1016/S0197-4580(03)00031-9
- Robinson, B.G., Khurana, S., Pohl, J.B., Li, W.-K., Ghezzi, A., Cady, A.M., Najjar, K., Hatch, M.M., Shah, R.R., Bhat, A., Hariri, O., Haroun, K.B., Young, M.C., Fife, K., Hooten, J., Tran, T., Goan, D., Desai, F., Husain, F., Godinez, R.M., Sun, J.C., Corpuz, J., Moran, J., Zhong, A.C., Chen, W.Y., Atkinson, N.S., 2012. A low concentration of ethanol impairs learning but not motor and sensory behavior in *Drosophila* larvae. *PLoS One* 7, e37394. doi:10.1371/journal.pone.0037394
- Ryabinin, A.E., Miller, M.N., Durrant, S., 2002. Effects of acute alcohol administration on object recognition learning in C57BL/6J mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 307–312. doi:10.1016/S0091-3057(01)00661-X
- Sher, L., 2006. Alcohol consumption and suicide. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* 99, 57–61. doi:10.1093/qjmed/hci146
- Shirpoor, A., Minassian, S., Salami, S., Khadem-Ansari, M.H., Ghaderi-Pakdel, F., Yeghiazaryan, M., 2009. Vitamin E protects developing rat hippocampus and cerebellum against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis. *Food Chem.* 113, 115–120. doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.034
- Sircar, R., Sircar, D., 2005. Adolescent rats exposed to repeated ethanol treatment show lingering behavioral impairments. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 1402–1410. doi:10.1097/01.alc.0000175012.77756.d9

- Skrzydłewska, E., Augustyniak, A., Michalak, K., Farbiszewski, R., 2005. Green tea supplementation in rats of different ages mitigates ethanol-induced changes in brain antioxidant abilities. *Alcohol* 37, 89–98. doi:10.1016/j.alcohol.2005.12.003
- Somani, S.M., Husain, K., Diaz-Phillips, L., Lanzotti, D.J., Kareti, K.R., Trammell, G.L., 1996. Interaction of exercise and ethanol on hepatic and plasma antioxidant system in rat. *Alcohol* 13, 603–310. doi:10.1016/S0928-4680(97)00162-4
- Sullivan, E. V, Deshmukh, A., Desmond, J.E., Lim, K.O., Pfefferbaum, A., 2000a. Cerebellar volume decline in normal aging, alcoholism, and Korsakoff's syndrome: relation to ataxia. *Neuropsychology* 14, 341–352.
- Sullivan, E. V, Deshmukh, A., Desmond, J.E., Mathalon, D.H., Rosenbloom, M.J., Lim, K.O., Pfefferbaum, A., 2000b. Contribution of alcohol abuse to cerebellar volume deficits in men with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 894–902.
- Sullivan, E. V, Pfefferbaum, A., 2005. Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology (Berl)*. 180, 583–594. doi:10.1007/s00213-005-2267-6
- Sunila, E., Kuttan, G., 2004. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. *J. Ethnopharmacol.* 90, 339–346. doi:10.1016/j.jep.2003.10.016
- Trevithick, J.R., Trevithick–Sutton, C.C., Dzialoszynski, T., Collins, M., Kolenko, M., Ajami, Z., 2005. Radical Scavenging by Lutein and Related Carotenoids May Contribute to Risk Reduction of AMD and Cataract . *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 3855.

- Vijayakumar, R.S., Surya, D., Nalini, N., 2004. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep.* 9, 105–110. doi:10.1179/135100004225004742
- Vishwanathan, R., Iannaccone, A., Scott, T.M., Kritchevsky, S.B., Jennings, B.J., Carboni, G., Forma, G., Satterfield, S., Harris, T., Johnson, K.C., Schalch, W., Renzi, L.M., Rosano, C., Johnson, E.J., 2014. Macular pigment optical density is related to cognitive function in older people. *Age Ageing* 43, 271–275. doi:10.1093/ageing/aft210
- Vishwanathan, R., Neuringer, M., Snodderly, D.M., Schalch, W., Johnson, E.J., 2013. Macular lutein and zeaxanthin are related to brain lutein and zeaxanthin in primates. *Nutr. Neurosci.* 16, 1–16. doi:10.1179/1476830512Y.0000000024.Macular
- Vishwanathan, R., Schalch, W., Johnson, E.J., 2015. Macular pigment carotenoids in the retina and occipital cortex are related in humans. *Nutr. Neurosci.* Mar 9. doi:10.1179/1476830514Y.0000000141
- Wang, M., Tsao, R., Zhang, S., Dong, Z., Yang, R., Gong, J., Pei, Y., 2006. Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1522–1529. doi:10.1016/j.fct.2006.04.005
- Wang, M.X., Jiao, J.H., Li, Z.Y., Liu, R.R., Shi, Q., Ma, L., 2013. Lutein supplementation reduces plasma lipid peroxidation and C-reactive protein in healthy nonsmokers. *Atherosclerosis* 227, 8–13. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.021

- Wang, W., Shinto, L., Connor, W.E., Quinn, J.F., 2008. Nutritional biomarkers in Alzheimer's disease: the association between carotenoids, n-3 fatty acids, and dementia severity. *J. Alzheimer's Dis. JAD* 13, 31–38.
- Wu, D., Cederbaum, A.I., 2003. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Res. Heal.* 27, 277–284.
- Xia, J., Simonyi, A., Sun, G.Y., 1999. Chronic Ethanol and Iron Administration on Iron Content , Neuronal Nitric Oxide Synthase , and Superoxide Dismutase in Rat Cerebellum. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 702–707.
- Zhao, Y.N., Wang, F., Fan, Y.X., Ping, G.F., Yang, J.Y., Wu, C.F., 2013. Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behav. Brain Res.* 236, 270–282. doi:10.1016/j.bbr.2012.08.052
- Zorumski, C.F., Mennerick, S., Izumi, Y., 2014. Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol* 48, 1–17. doi:10.1016/j.alcohol.2013.09.045

**Table 1** - Effect of administration of lutein (15–100 mg/kg) for 14 days, on exploratory behavior of animals (number of crossing and rearing responses), during the habituation session in object recognition task.

Groups	Crossing	Rearing	N
Olive oil	81.6 ± 3.6	46.6 ± 2.7	10
Lutein 15 mg/kg	71.2 ± 4.7	42.5 ± 3.3	10
Lutein 50 mg/kg	75.8 ± 6.7	42.7 ± 4.0	9
Lutein 100 mg/kg	70.1 ± 8.7	37.1 ± 5.1	9
Statistical analysis	$F_{(3,34)} = 0.7552$ $p > 0.05$	$F_{(3,34)} = 1.020$ $p > 0.05$	

Data are means ± SEM; N, number of animals in each group.

**Table 2** - Effect of sub-chronic administration of ethanol (0.3–3 g/kg) for 7 days on exploratory behavior of animals (number of crossing and rearing responses), during the habituation session in object recognition task.

Groups	Crossing	Rearing	N
Saline 0.9 %	78.8 ± 9.4	43.5 ± 6.9	10
Ethanol 0.3 g/kg	81.1 ± 8.2	46.6 ± 3.1	10
Ethanol 1 g/kg	94.9 ± 6.1	47.6 ± 3.5	10
Ethanol 3 g/kg	76.2 ± 8.2	40.0 ± 2.6	11
Statistical analysis	$F_{(3,37)} = 1.049$ $p > 0.05$	$F_{(3,37)} = 0.6262$ $p > 0.05$	

Data are means ± SEM; N, number of animals in each group.

**Table 3** - Effect administration of lutein (50 mg/kg), ethanol (3 g/kg), and the co-administration of ethanol and lutein, on exploratory behavior of animals (number of crossing and rearing responses), during the habituation session in object recognition task.

<b>Groups</b>	<b>Crossing</b>	<b>Rearing</b>	<b>N</b>
Olive oil/Saline	87.0 ± 3.8	42.3 ± 2.9	11
Olive oil /Ethanol	92.1 ± 7.1	48.9 ± 1.4	11
Lutein/Saline	87.2 ± 9.4	39.9 ± 2.7	11
Lutein/Ethanol	80.2 ± 8.4	41.6 ± 3.8	10
Statistical analysis	$F_{(3,39)} = 0.6610$ $p > 0.05$	$F_{(3,39)} = 0.8508$ $p > 0.05$	

Data are means ± SEM; N, number of animals in each group.

## Figure legends

**Figure 1.** Schematic representation of the experimental protocol for dose–response curve of lutein.

**Figure 2.** Schematic representation of the experimental protocol for dose–response curve of ethanol.

**Figure 3.** Schematic representation of the experimental protocol for administration of lutein and ethanol.

**Figure 4.** Administration of lutein (15–100 mg/kg) for 14 days on the discrimination index in the object recognition task. Data are mean  $\pm$  SEM, for  $n = 9-10$  animals in each group. \* Indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) compared with control group (Olive Oil).

**Figure 5.** Administration of ethanol (0.3–3 g/kg) for 7 days on the discrimination index in the object recognition task. Data are mean  $\pm$  SEM, for  $n = 10-11$  animals in each group. \* Indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) compared with control group (Saline).

**Figure 6.** Administration of lutein (50 mg/kg), ethanol (3 g/kg), and the co-administration of ethanol and lutein on the discrimination index in the object recognition task. Data are mean  $\pm$  SEM, with  $n = 10-11$  animals in each group. \*



Indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) compared with control group (Olive Oil/Saline).

**Figure 7.** Administration of lutein (50 mg/kg), ethanol (3 g/kg), and the co-administration of ethanol and lutein on oxidative stress indicators (A) Superoxide Dismutase, (B) MDA and (C) Non-protein thiol in the hippocampus of rats. Data are mean  $\pm$  SEM, for  $n = 10-11$  animals in each group.

**Figure 8.** Administration of lutein (50 mg/kg), ethanol (3 g/kg), and the co-administration of ethanol and lutein on oxidative stress indicators (A) Superoxide Dismutase, (B) MDA and (C) Non-protein thiol in the cerebral cortex of rats. Data are mean  $\pm$  SEM, for  $n = 10-11$  animals in each group.

Figures

Figure 1.

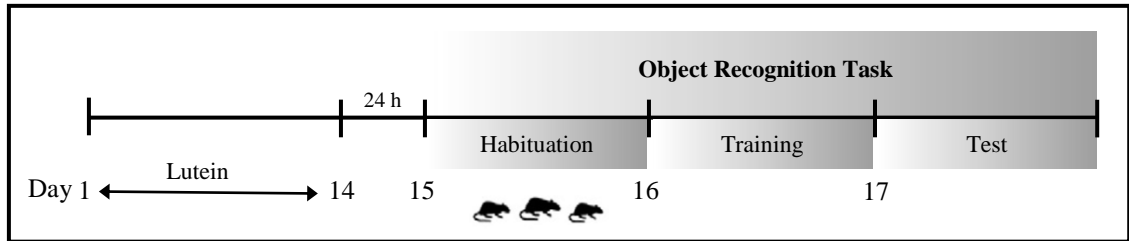


Figure 2.

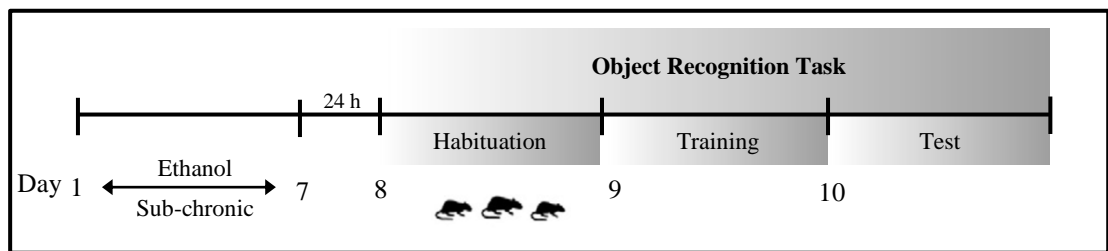


Figure 3.

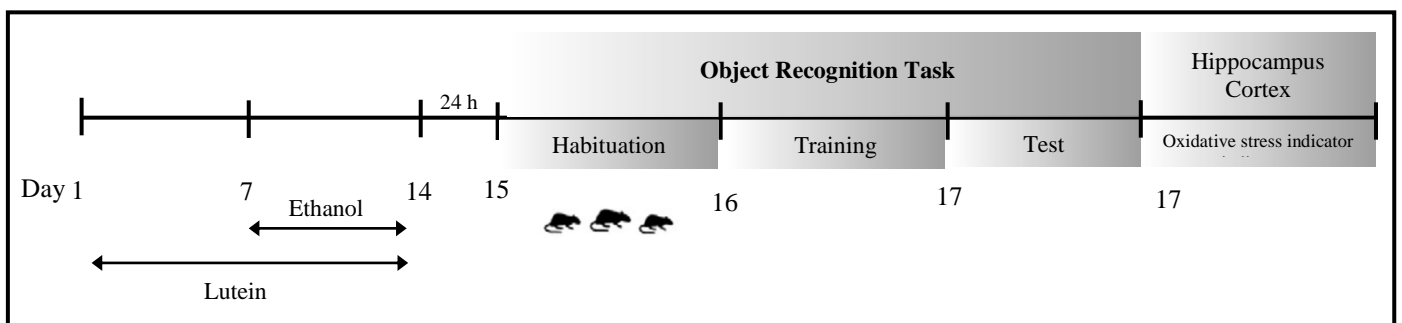


Figure 4.

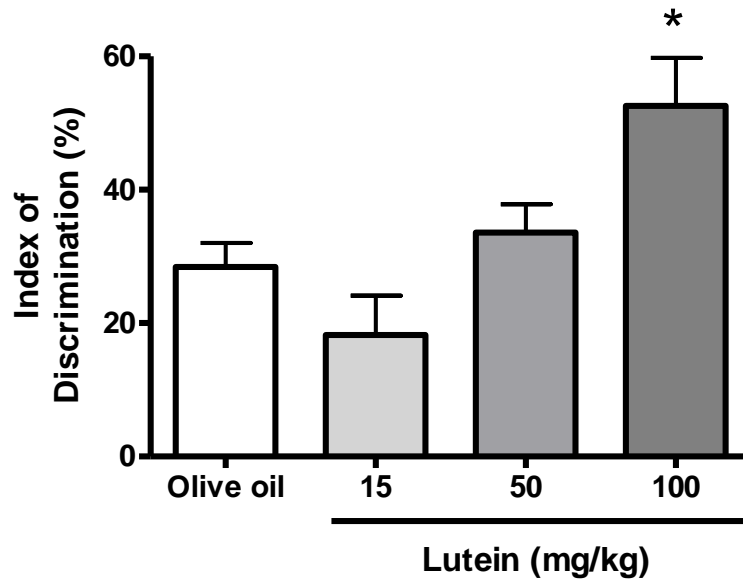


Figure 5.

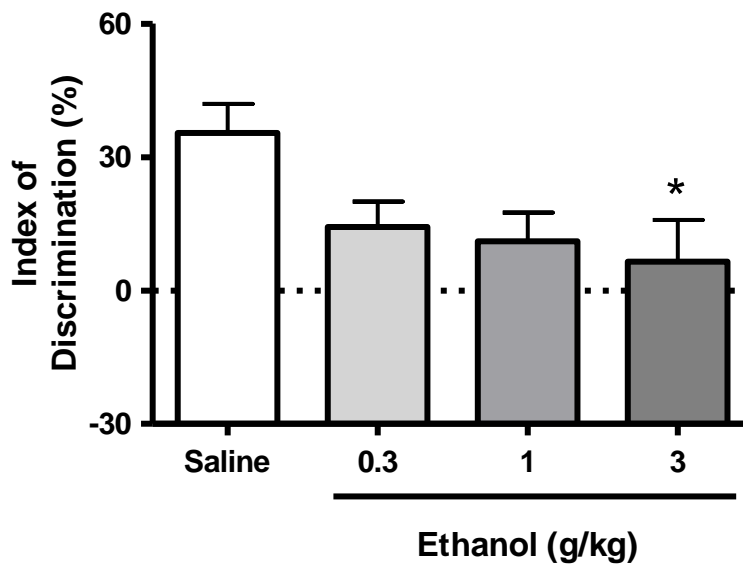


Figure 6.

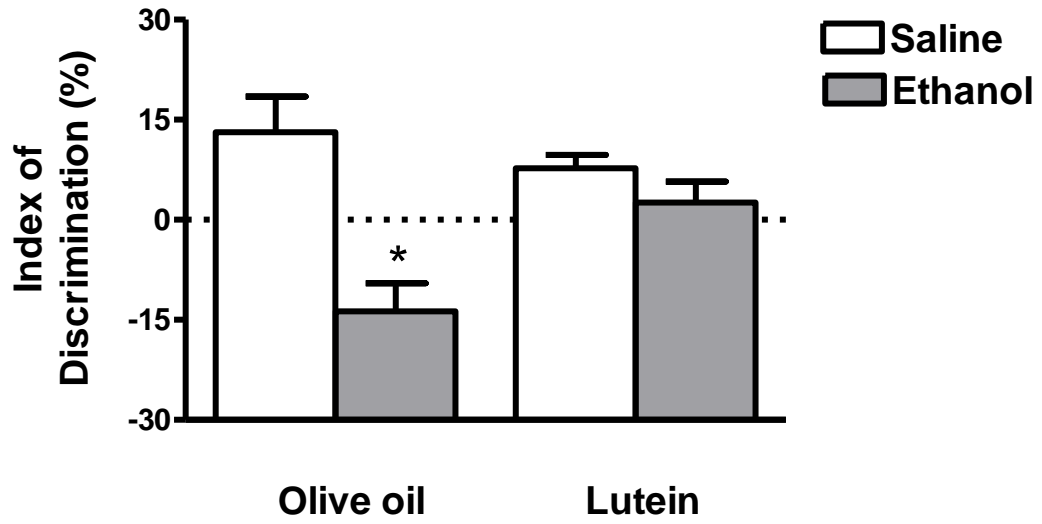


Figure 7.

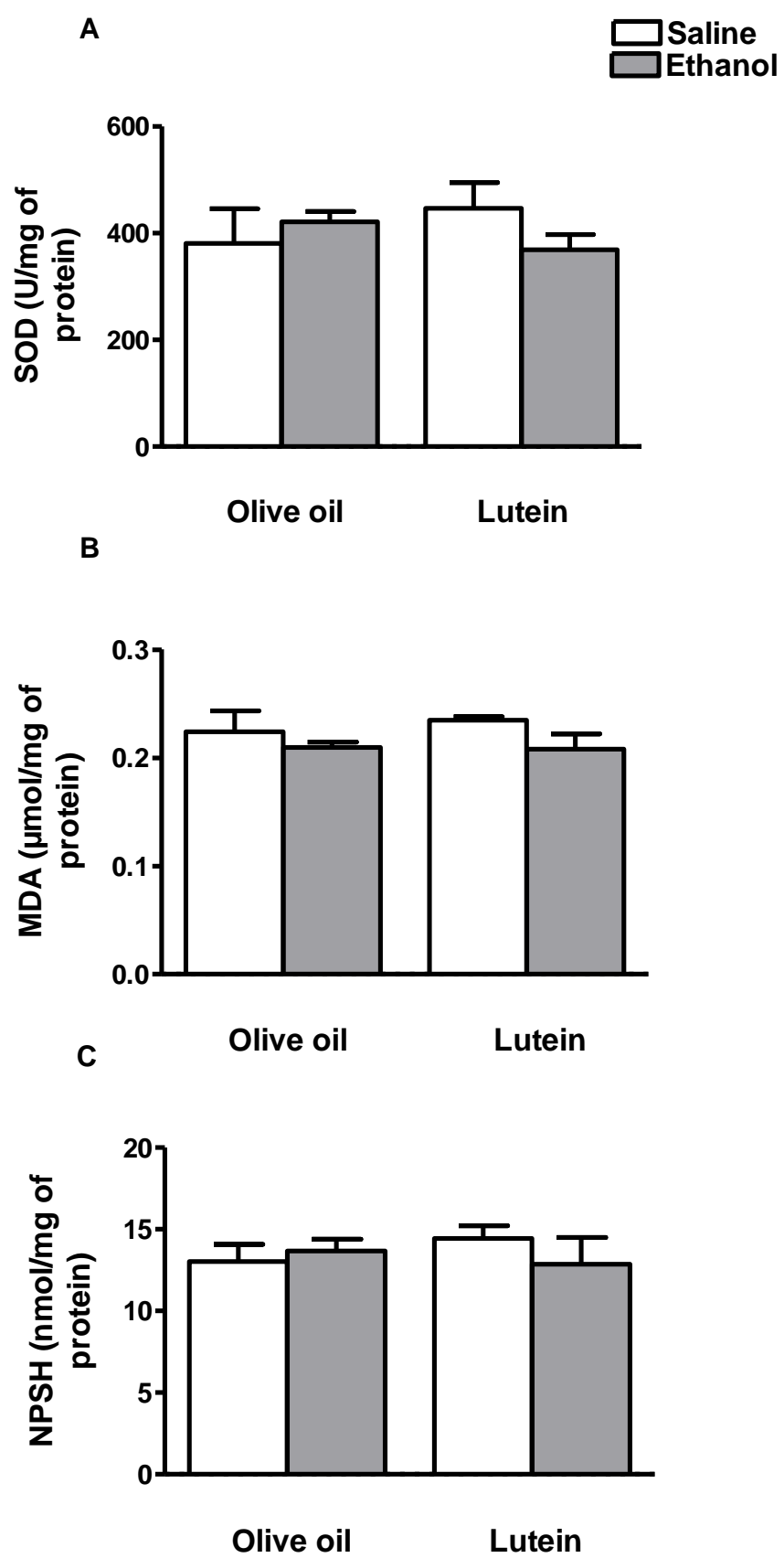
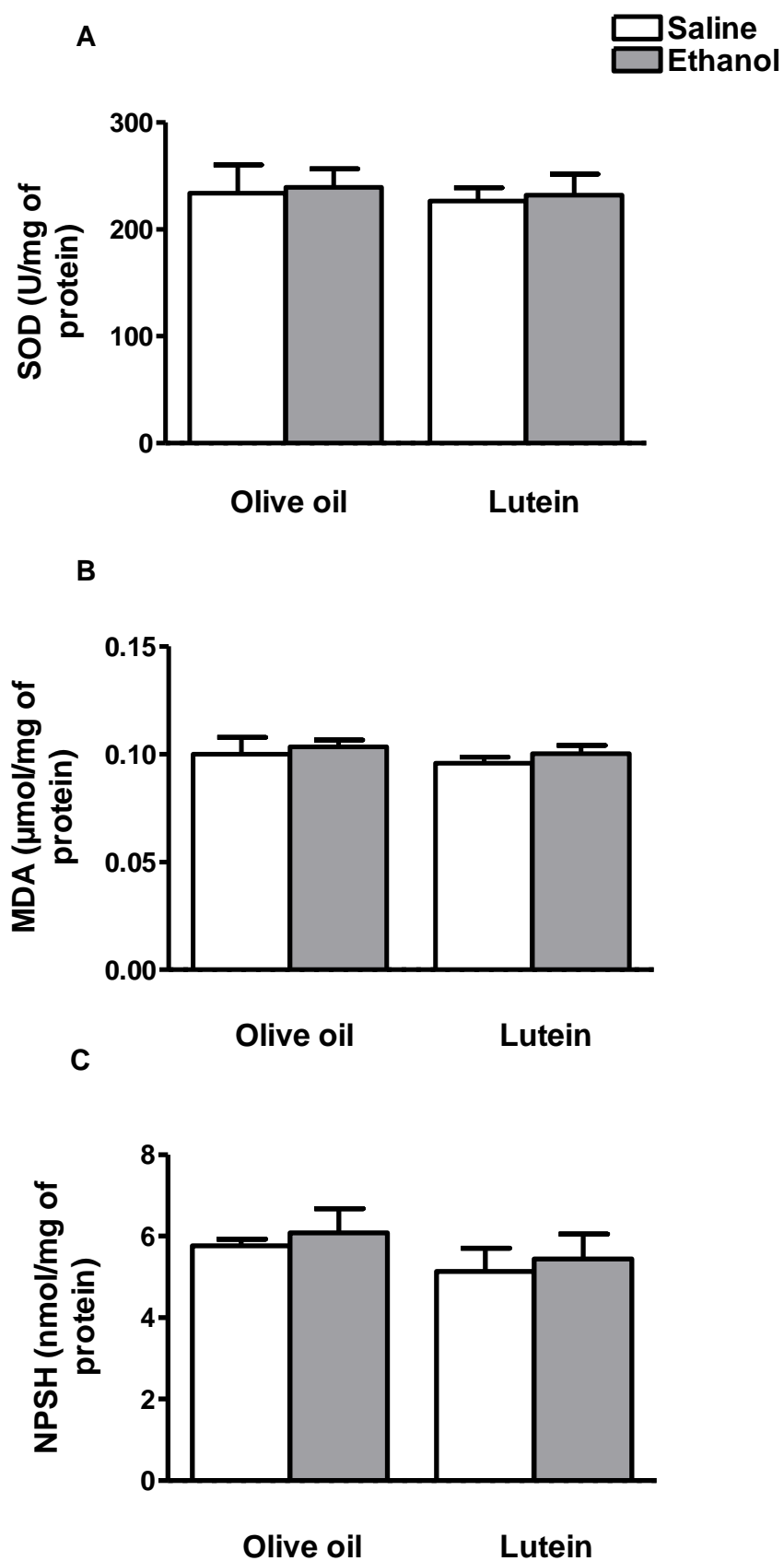


Figure 8.



## 7. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente trabalho demonstraram que:

A administração sub-crônica de etanol (3 g/kg) causa déficit de memória em ratos na tarefa de reconhecimento de objetos.

A administração de luteína (100 mg/kg) melhora a memória dos ratos na tarefa de reconhecimento de objetos, enquanto as doses de 15 ou 50 mg/kg não apresentaram efeito.

A administração de luteína (50 mg/kg) previne o déficit de memória induzido por etanol.

A administração de luteína, etanol e a combinação luteína e etanol não alteraram os parâmetros de estresse oxidativo avaliados no córtex e no hipocampo. Sugerindo que a prevenção do déficit de memória induzido por etanol não envolve estresse oxidativo no córtex e no hipocampo.

Assim, baseado nos resultados obtidos, a luteína pode ser considerada uma alternativa no tratamento dos déficits de memória induzidos por etanol, entretanto, mais estudos são necessários para avaliar o mecanismo envolvido neste efeito.