

Inês de Oliveira Lourenço Lopes

Efeito de Compostos Químicos na Atividade Sináptica

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Julho/2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Inês de Oliveira Lourenço Lopes

Efeito de Compostos Químicos na Atividade Sináptica

Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Química, orientada pelas
Professoras Doutoras Rosa M. Quinta-Ferreira e M. Emília Quinta-Ferreira e apresentada ao
Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade
de Coimbra.

Supervisores:

Prof. Dra. Rosa M. Quinta-Ferreira

Prof. Dra. M. Emília Quinta-Ferreira

Coimbra, 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“If you know you are on the right track, if you have this inner knowledge, then nobody can turn you off, no matter what they say.”

Barbara McClintock

Agradecimentos

À orientadora, Professora Emília Quinta-Ferreira, por me orientar tão bem neste longo percurso que foi a elaboração desta dissertação, por estar sempre presente quando era preciso e por todo o carinho dado.

À orientadora, Professora Rosa Quinta-Ferreira, por todo o apoio e orientação prestada.

Ao Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra por toda a disponibilidade prestada e pelo fornecimento de material biológico necessário para a elaboração deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pela companhia, pela partilha e ajuda dada ao longo desta jornada.

Aos meus amigos mais próximos por sempre estarem presentes, por serem a minha família de Coimbra e por todo a força dada.

À família pela atenção e apoio prestados ao longo deste percurso.

Resumo

Com a crescente incidência de doenças, como as de Alzheimer e de Parkinson e mesmo a depressão, tem havido também uma preocupação acrescida na procura das suas causas, dos mecanismos celulares nelas envolvidos e de novas formas de tratamento. Deste modo, torna-se crucial o estudo do efeito que certos compostos químicos podem ter no sistema nervoso central. Sabe-se que estas doenças podem estar associadas a uma libertação excessiva de zinco neuronal pretendendo-se, por isso estudar variações sinápticas de zinco usando um indicador fluorescente e também sinais correspondentes de autofluorescência. Os estudos foram efetuados nas sinapses das fibras musgosas, localizadas na área CA3 do hipocampo, que são muito ricas em zinco vesicular. As variações de zinco foram induzidas pelos compostos KCl e TEA, que despolarizam a membrana celular causando plasticidade sináptica e pelo ácido oleico, cujo efeito se pretende conhecer na atividade neuronal.

O ácido oleico é um composto químico monoinsaturado que existe, em abundância no azeite e na amêndoa, apresentando muitos benefícios nutricionais e medicinais sendo, por isso, usado em diversas aplicações. No entanto, devido à crescente industrialização no setor alimentar, nomeadamente na produção de azeite e de leite de amêndoa, a presença do ácido oleico em concentrações elevadas poderá ser frequente nos seus efluentes. Por este motivo, pretende-se investigar o impacto deste composto em movimentos sinápticos de zinco e em sinais de autofluorescência, com origem em flavoproteínas existentes na mitocôndria.

Um dos mecanismos desencadeados pela presença de KCl, que pode ser encontrado em quantidades consideráveis em efluentes de destilarias, e por TEA é a indução da potenciação de longa duração, que está associada a uma libertação intensa de zinco para a fenda sináptica. Estes dois compostos, cujo efeito na atividade elétrica neuronal já é conhecido, originaram sinais de autofluorescência, opostos, nomeadamente uma potenciação no caso do KCl e uma depressão na presença de TEA, que eram parcialmente reversíveis. A amplitude da potenciação induzida por KCl dependia da osmolaridade do meio extracelular, sendo maior para uma osmolaridade normal. Quanto aos sinais de zinco, foram medidas variações induzidas pela aplicação de TEA, tendo-se verificado resultados semelhantes aos obtidos para os sinais de autofluorescência. Para avaliar o envolvimento dos canais de potássio

dependentes de ATP, que são ativados por zinco, na depressão induzida por TEA, aplicou-se tolbutamida que é um bloqueador daqueles canais.

No estudo do efeito do ácido oleico foram analisadas variações de sinais de autofluorescência e de zinco. As medidas de autofluorescência foram efetuadas usando duas concentrações, 20 μM e 40 μM , tendo-se registado um pequeno aumento reversível para a concentração de 40 μM . No caso dos sinais de zinco aplicaram-se cinco concentrações, 10 μM , 20 μM , 40 μM , 60 μM e 100 μM mas apenas se verificaram aumentos da intensidade de fluorescência para as concentrações de 20 μM e 100 μM , que também são reversíveis. Conclui-se por isso que, ao contrário do que acontece com o KCl e TEA, em que depois da sua remoção a atividade sináptica fica, geralmente potenciada, os sinais recuperam depois da aplicação das concentrações usadas de ácido oleico, sugerindo que ele não altera o estado fisiológico neuronal.

Palavras-Chave: zinco; ácido oleico; autofluorescência; sinapses das fibras musgosas; área CA3 do hipocampo.

Abstract

With the increasing incidence of diseases, like Alzheimer's, Parkinson's and even depression, there has been increased concern in searching for their causes, the cellular mechanisms involved and for new ways of treatment. Thus, it becomes crucial to study the effect that certain chemical compounds may have in the central nervous system. It is known that these diseases may be associated with excessive neuronal zinc release, being therefore, the aim to study synaptic zinc changes using a fluorescent indicator and also corresponding autofluorescence signals. The studies were performed at the mossy fiber synapses, localized area in CA3 area of the hippocampus, that are very rich in vesicular zinc. The zinc changes were induced by the KCl and TEA compounds that depolarize the cell membrane causing synaptic plasticity and by oleic acid, with the aim of knowing its effect in neuronal activity. Oleic acid is a monounsaturated chemical compound, existing in abundance in olive oil and almonds, that has many nutritional and medicinal benefits being, therefore, used in several applications. However, due to the increasing industrialization in the food sector, namely in the production of olive oil and almond milk, the presence of oleic acid in high concentrations in their effluents may be frequent. Thus, the present work aims to study the impact of this compound in synaptic zinc movements and in autofluorescence signals from flavoproteins existing in the mitochondria. One of the mechanisms triggered by the presence of KCl, that can be found in high amounts in distillery effluents, and by TEA is the induction of long-term potentiation, which is associated with intense zinc release into the synaptic cleft. These two compounds, whose effect on neuronal electrical activity is already known, originated opposite autofluorescence signals, namely an enhancement in the case of KCl and a depression in the presence of TEA, which were partially reversible. The magnitude of the KCl induced potentiation depended on the osmolality of the extracellular medium, being higher for a normal osmolarity. As for the zinc signals, the observed TEA evoked changes were similar to those of the autofluorescence measurements. To assess the involvement of ATP-sensitive potassium channels, which are activated by zinc, in the TEA evoked zinc depression, tolbutamide, a blocker of those channels, was applied.

In the study of the effect of oleic acid, autofluorescence and zinc changes were analysed. The autofluorescence measurements were performed using two concentrations, 20 μM and 40 μM , having a small reversible enhancement been observed for the 40 μM concentration. As for the zinc signals, five concentrations were applied, 10 μM , 20 μM , 40 μM , 60 μM and 100 μM , having increased fluorescence intensities, that were also reversible, been detected only for the 20 μM and 100 μM concentrations. Therefore, it is concluded that, unlike what happens with KCl and TEA, for which synaptic activity is generally potentiated upon their removal, the signals recover after the applied concentrations of oleic acid, suggesting that it does alter the physiological neuronal state.

Keywords: zinc; oleic acid; autofluorescence; mossy fiber synapses, hippocampal CA3 area.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	vi
Índice	viii
Índice de Tabelas	x
Índice de Figuras	xi
Abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
1.1 Objetivo	1
1.2 Motivação	1
1.3 Estrutura da dissertação	2
2. Fundamentos Teóricos	3
2.1 Hipocampo	3
2.2 Transmissão Sináptica	5
2.3 Autofluorescência	7
2.4 Plasticidade sináptica e potenciação de longa duração	9
2.5 O zinco no sistema nervoso central	10
2.6 O ácido oleico na amêndoa e no azeite	11
3. Estado de Arte	15
3.1 A LTP no hipocampo	15
3.2 O zinco no hipocampo	19
3.3 O efeito na saúde dos compostos da amêndoa	26
3.4 O efeito na saúde dos compostos do azeite	28

4.	Procedimentos experimentais e materiais	31
4.1	Arranjo Experimental.....	31
4.2	Preparação de fatias do hipocampo e detecção de sinais óticos	33
4.3	Medição de sinais de autofluorescência.....	34
4.4	Medição de sinais de zinco.....	35
4.5	Preparação de soluções	36
4.6	Produtos químicos utilizados.....	38
5.	Resultados	39
5.1	Sinais de autofluorescência.....	39
5.1.1	Comparação de sinais de autofluorescência com sinais de zinco.....	39
5.1.2	Efeito de KCl e da osmolaridade em sinais de autofluorescência.....	40
5.1.3	Ação do quelante de zinco, Ca-EDTA, em sinais de autofluorescência.....	42
5.1.4	Variações de autofluorescência induzidas por TEA	43
5.1.5	Efeito do ácido oleico em sinais de autofluorescência	45
5.2	Estudos de variações de zinco	46
5.2.1	Sinais de zinco induzidos por TEA	46
5.2.2	Efeito do ácido oleico em sinais de zinco.....	48
6.	Discussão	53
7.	Conclusões e perspectivas futuras	57
	Bibliografia	59
	Netgrafia	67
	ANEXOS	69

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Efeito de certos métodos/compostos na LTP.	16
Tabela 2 - Resultados para diferentes indicadores de zinco	19
Tabela 3 – Estudos realizados para diferentes quelantes de zinco e os seus efeitos.	23
Tabela 4 - Alguns tipos de antagonistas e agonistas.	25
Tabela 5 - Efeitos na saúde provocados por compostos da amêndoa.....	26
Tabela 6 - Efeitos na saúde de compostos do azeite.	29
Tabela 7 - Composição da amêndoa.	69
Tabela 8 - Composição do azeite.	72

Índice de Figuras

Figura 1 - Formação hipocampal.	4
Figura 2 - Fatia transversal do hipocampo.	5
Figura 3 - Representação esquemática de uma sinapse elétrica (esquerda) e de uma sinapse química (direita).	6
Figura 4 - Espectro de excitação e de emissão do NADH e do FAD.	8
Figura 5 - Estrutura química do ácido oleico.	12
Figura 6 - Microscópio de fluorescência.	32
Figura 7 - Bomba peristáltica.	32
Figura 8 - Cérebro de rato Wistar.	33
Figura 9 - Representação de uma fatia do hipocampo com indicação das suas áreas. A zona limitada pela linha cor de laranja indica a parte da área CA3 onde se fazia incidir a luz.	34
Figura 10 - Indicador de zinco (Newport Green).	35
Figura 11 - Espectro de excitação do indicador Newport Green em condições de baixo zinco intracelular.	36
Figura 12 Sinais de autofluorescência de fatias não incubadas (azul, n=7) e sinais de zinco obtidos de fatias incubadas com Newport Green (5 μ) (verde, n=7).	40
Figura 13 - Efeito do KCl nos sinais de autofluorescência.	41
Figura 14 - Efeito do quelante de zinco Ca-EDTA, em sinais de autofluorescência, induzidos pelo meio de KCl hiperosmótico (n=3).	43
Figura 15 - Efeito de TEA, que provoca a indução química da LTP, em sinais de autofluorescência (n=4).	44
Figura 16 - Efeito do ácido oleico nos sinais de autofluorescência.	45
Figura 17 - Efeito nos sinais de zinco após a introdução de TEA.	47
Figura 18 - Sinais de zinco na presença de TEA e de TEA + tolbutamida, (n=4).	48
Figura 19 - Efeito de várias concentrações de ácido oleico em sinais de zinco.	49

Figura 20 – Intensidade da fluorescência normalizada dos sinais de zinco para as várias concentrações do ácido oleico. 50

Figura 21 – Efeito de bloqueadores da transmissão sináptica no sinal de zinco induzido pelo ácido oleico (40 μ M). 51

Abreviaturas

ACSF: solução cerboespinal artificial

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- ácido isoxazolepropiónico

APV: ácido 2-amino-5-fosfonopentanóico

Ca-EDTA: ácido etilenodiaminotetracético saturado com cálcio

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina

DMSO: dimetil sulfóxido

FAD: dinucleótido de flavina e adenina

GABA: ácido γ -aminobutírico

Her-2/Neu: oncogene localizado no cromossoma 17 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*)

IL-6: interleucina-6

IP3: trifosfato de inositol

K_{ATP}: canais de potássio dependentes de ATP

LDL: lipoproteínas de baixa densidade.

LTP: potenciação de longa duração (*long-term potentiation*)

mGluR: recetores metabotrópicos de glutamato

NADH: forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida e adenina

NMDA: N-metil D-Aspartato

NR1/NR2B: recetores NMDA

NVP-AAM077: ((1S) -1 (4-bromofenil) etil] amino} - (2,3-dioxo-1,4-dihydroquinoxalin-5-il) metil) fosfónico

SIRT1: Proteína NAD-dependente desacetilase sirtuina-1

PGC1- α : coativador 1-alfa do recetor ativado por proliferadores de peroxisoma gama

TEA: tetraetilamônio

TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa

TSQ: 6-metoxi-(8-p-toluenossulfonamida) quinolina

VDCCs: canais de Ca²⁺ dependentes do potencial

1. Introdução

1.1 Objetivo

Este trabalho tem como principal objetivo o estudo do efeito na saúde do ácido oleico, também conhecido como ômega 9, que está presente em elevadas quantidades no azeite e na amêndoa. Em particular pretende-se investigar o seu efeito na atividade sináptica comparando-o com as ações induzidas pelos compostos despolarizantes KCl e TEA. Para isso, será feito um estudo do impacto que estes compostos têm em sinais de autofluorescência e na libertação de zinco e nos sinais de autofluorescência. O estudo é realizado nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo do rato. Foi escolhida esta área uma vez que é a área cerebral com maior concentração de zinco, livre ou fracamente ligado, em vesículas sinápticas.

1.2 Motivação

Com a crescente industrialização, principalmente na área alimentar, a produção de efluentes torna-se um aspeto importante a ter em consideração. Os efluentes podem conter quantidades enormes de substâncias que se não forem devidamente tratadas podem trazer consequências à saúde humana.

O ácido oleico é um composto que existe em quantidades elevadas no azeite e na amêndoa. O azeite é um dos alimentos mais consumidos na área do Mediterrâneo e o consumo da amêndoa tem vindo a aumentar, principalmente pela crescente procura do leite de amêndoa e pelos efeitos benéficos deste alimento na saúde.

Relativamente ao KCl e ao TEA, compostos que provocam a despolarização da membrana celular e a indução química da LTP, pretende-se analisar o efeito destes em sinais de autofluorescência e de zinco. O KCl pode ser encontrado em efluentes de algumas indústrias, como por exemplo das destilarias (Ansari, Awasthi e Srivastava 2012).

Pretende-se portanto estudar o efeito destes compostos químicos no cérebro, mais concretamente nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo.

1.3 Estrutura da dissertação

No capítulo 2 é feita uma revisão dos conteúdos abordados ao longo do presente trabalho. Primeiramente, são introduzidos alguns fundamentos básicos acerca da anatomia do hipocampo, bem como sobre a transmissão sináptica. Depois, descrevem-se os fenómenos de autofluorescência e a potenciação de longa duração (*long-term potentiation*, LTP) e aborda-se também a importância do zinco no sistema nervoso central. Por fim, são feitas referências a dois alimentos, o azeite e a amêndoa, que são ricos em ácido oleico, frisando a importância que este composto tem sobretudo na área medicinal.

O capítulo 3 contém uma revisão bibliográfica de estudos efetuados sobre a LTP no hipocampo, focando os mecanismos subjacentes a este fenómeno. De seguida, aborda-se a importância do zinco no cérebro, mencionando-se diversos indicadores, quelantes e bloqueadores utilizados nos estudos efetuados acerca desta temática. Termina-se este capítulo com uma breve revisão bibliográfica sobre a importância de alguns compostos presentes na amêndoa e no azeite, na saúde.

No capítulo seguinte, capítulo 4, é descrito o arranjo experimental bem como os métodos utilizados para a realização das experiências. São também apresentadas os vários procedimentos para a preparação das soluções utilizadas durante a realização deste trabalho.

No capítulo 5 são apresentados os resultados obtidos e, no capítulo seguinte, capítulo 6, é feita a sua discussão. Por fim, no capítulo 7, são apresentadas as conclusões e as perspetivas futuras.

2. Fundamentos Teóricos

Neste capítulo, são iniciados os fundamentos teóricos subjacentes a este trabalho. Iniciar-se-á por uma pequena abordagem à caracterização da amêndoa e do azeite e os seus compostos, reforçando a importância do ácido oleico. De seguida, é feita uma breve descrição do hipocampo e dos seus circuitos neuronais principais. Dentro desta temática são abordados os conceitos de autofluorescência e LTP e ainda a importância do zinco no cérebro.

2.1 Hipocampo

O cérebro é o órgão onde se localiza o sistema nervoso. Este atua sobre os restantes órgãos do corpo, sendo um dos mais complexos do organismo humano.

O hipocampo, que possui uma simetria bilateral, é uma das divisões que o cérebro apresenta e está localizado em baixo do córtex central. Este encontra-se presente apenas nos mamíferos, estando a região do qual ele deriva (*pallium* medial) presente em todos os vertebrados.

Quanto às suas funções, o hipocampo, apresenta um importante papel na formação de memórias, no controlo de atenção e emoções e na função olfativa. (Andersen, et al. 2007).

O hipocampo está inserido num conjunto de áreas que, no todo, constituem a formação hipocampal. Esta formação divide-se em 6 regiões, das quais se podem destacar a fascia dentada, o hipocampo, o *subiculum*, *presubiculum*, *parasubiculum* e o córtex entorrinal (Andersen, et al. 2007). Na Figura 1, podem-se observar estas regiões organizadas na formação hipocampal.

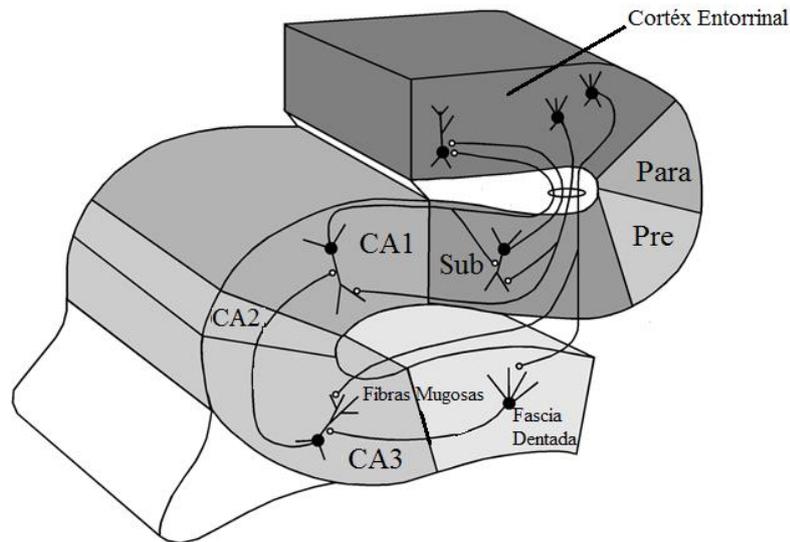


Figura 1- Formação hipocmpal. (Adaptado de Andersen et. al., 2007)

Focando apenas no hipocampo, este aparenta ter um formato em forma de “C” e é dividido em três subdivisões (*cornu ammonis*), CA1, CA2 e CA3. As áreas, referidas anteriormente, são constituídas por um conjunto de células designadas por células piramidais que formam uma fina camada. No fundo desta camada encontra-se uma zona designada por *stratum oriens*, que contém as dendrites basais (projeção ramificada das terminações neuronais de onde se propaga a estimulação eletroquímica) e inúmeros interneurónios. Na continuação, e em sentido ascendente, encontra-se a camada *stratum pyramidale*. Posteriormente, e apenas na área CA3, segue-se a camada *stratum lucidum*, formada pelas fibras musgosas. Após a *stratum lucidum*, na área CA3, e a *stratum pyramidale*, nas áreas CA1 e CA2, vem a *stratum radiatum*. Por fim, a zona mais externa do hipocampo, camada onde as fibras provenientes do córtex entorrinal terminam, designa-se por *stratum lacunosum-moleculare* (Andersen, et al. 2007). A Figura 2 representa uma fatia do hipocampo, e os circuitos neurais principais desta região.

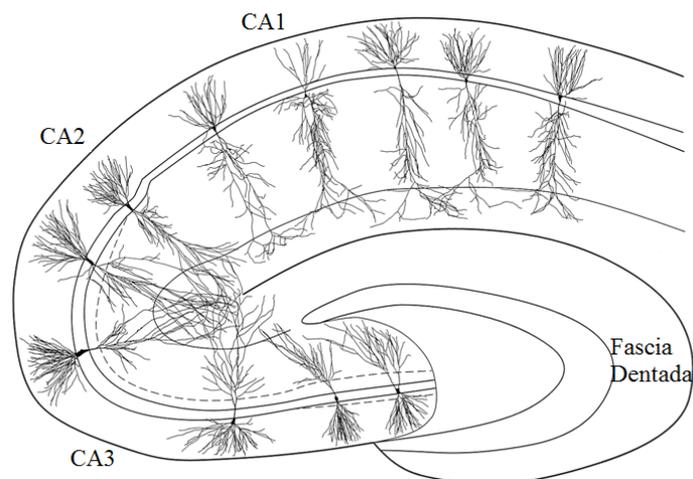


Figura 2 - Fatia transversal do hipocampo. (Adaptado de Andersen et. al., 2007)

2.2 Transmissão Sináptica

As sinapses são estruturas que permitem enviar sinais extremamente rápidos para outros neurónios ou para células não neuronais, como é o caso das fibras musculares. (H. Hennig s.d.).

Estas podem ser de dois tipos: sinapses químicas ou sinapses elétricas. As sinapses químicas são caracterizadas pela transmissão de neurotransmissores por um neurónio (zona pré-sináptica) e pela deteção do neurotransmissor por um neurónio adjacente (zona pós-sináptica) (E. Pereda 2014). A zona pré-sináptica é caracterizada pela presença de vesículas de exocitose onde se encontram as moléculas de neurotransmissores e a zona pós-sináptica é onde se encontram os seus recetores, localizados na membrana daquela região. Estas duas zonas são separadas por uma região que se designa por fenda sináptica (Andersen, et al. 2007).

As sinapses elétricas possuem canais intercelulares que permitem a passagem de iões ou pequenas moléculas de uma célula para a outra. Estas sinapses encontram-se ligadas por uma estrutura designada por *gap junction* e, ao contrário das sinapses químicas, não possuem zona pós nem pré-sináptica, pois não existe uma direção definida de fluxo de sinal. Além da

transmissão de iões (atividade elétrica), as *gap junction* também permitem a troca de pequenas moléculas como as cAMP e IP₃ (H. Hennig s.d.).

Na Figura 3 é possível observar a distinção entre os dois tipos de sinapses.

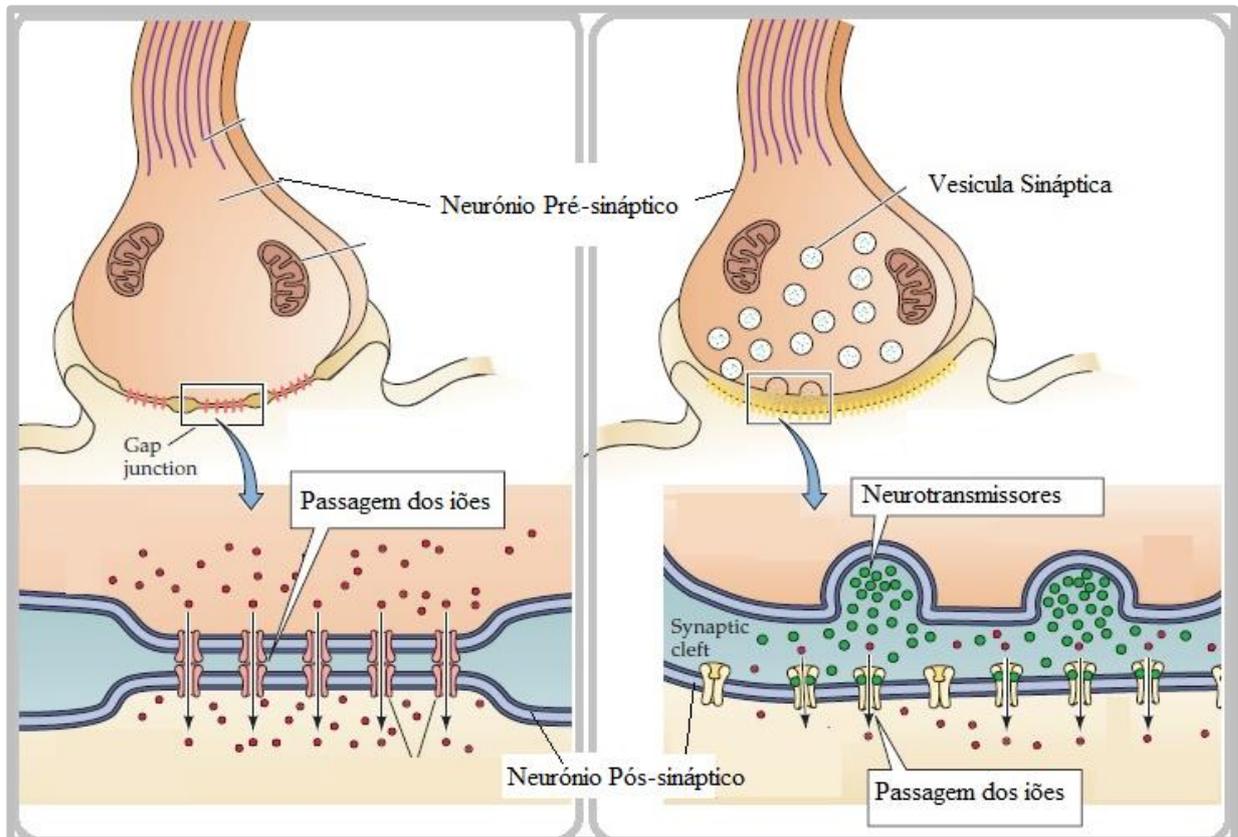


Figura 3 - Representação esquemática de uma sinapse elétrica (esquerda) e de uma sinapse química (direita). Adaptado de Purves, *et al.* 2004.

Dentro das sinapses químicas existem dois tipos de transmissão de sinal: via inibitória ou excitatória, que dependem dos neurotransmissores envolvidos e de como estes afetam o neurónio pós-sináptico. O tipo de neurotransmissores libertados (que originam o potencial pós-sináptico) determina a probabilidade de ocorrer ou não um potencial no neurónio pós-sináptico (impulso nervoso). Forma-se um potencial pós-sináptico excitatório se a probabilidade da ocorrência de um impulso na região potencial pós-sináptica for elevada. Caso contrário, verifica-se uma ação pós-sináptica inibitória. Por exemplo, quando os recetores de neurotransmissores característicos da resposta excitatória são ativados, os canais

não seletivos de cátions permitem a entrada de Na^+ e a saída de K^+ , de acordo os seus gradientes de concentração, o que faz com que se forme um potencial de ação na célula pós-sináptica. Quando os recetores dos neurotransmissores inibitórios são ativados, abrem-se canais de Cl^- . A entrada destes iões provoca uma hiperpolarização da membrana pós-sináptica o que faz com que não haja ocorrência de um potencial de ação. Tal acontecimento origina uma resposta inibitória (Purves, et al. 2004).

O neurotransmissor excitatório mais abundante no hipocampo é o glutamato, enquanto que o inibitório, GABA (ácido γ -aminobutírico) (Andersen, et al. 2007).

Quanto aos recetores ionotrópicos (que contêm canais permeáveis a iões) de neurotransmissores excitatórios existem três tipos: AMPA, kainato e NMDA. Dentro dos recetores metabotrópicos (a sua ativação origina a libertação de Ca^{2+} intracelular) existem três recetores que se encontram ligados a uma proteína G. Estes denominam-se mGluRs I, II e III (Andersen, et al. 2007). Os recetores ionotrópicos, quando ativados pelos neurotransmissores, permitem a passagem de iões de sódio, potássio e/ou cálcio.

2.3 Autofluorescência

O fenómeno de fluorescência consiste na emissão de luz quando uma determinada molécula absorve um fóton e passa ao estado excitado. Ou seja, quando isso acontece, ocorre uma libertação de fótons que emite luz com uma determinada frequência e comprimento de onda.

A autofluorescência define-se como a fluorescência emitida por estruturas biológicas intrínsecas, quando são excitadas por radiação UV/Vis. Algumas dessas estruturas estão associadas a mitocôndrias e lisossomas e incluem proteínas que contêm aminoácidos aromáticos, como NADH, FAD e lipopigmentos (Monici 2005).

Estudos efetuados demonstraram que a autofluorescência proveniente do NADH é um indicador do metabolismo glicólico e oxidativo. Foi ainda concluído que observando a autofluorescência das flavoproteínas se pode verificar o estado oxidativo dos tecidos (Kosterin, et al. 2005) (C. Reinert, et al. 2007).

O NADH tem espectros de excitação e de emissão com valores máximos, respectivamente, para os comprimentos de onda 340 nm e 460 nm. Quanto ao FAD, relativamente aos valores máximos dos mesmos espectros verificam-se para comprimentos de onda de 450 nm e emite nos 530 nm (R. Lakowicz 2006). A Figura 4 mostra os respectivos espectros.

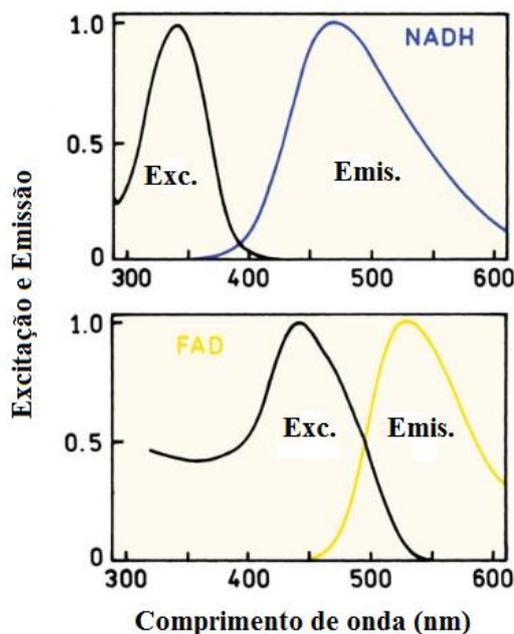


Figura 4 - Espectro de excitação e de emissão do NADH e do FAD. Adaptado de R. Lakowicz, 2006.

Em estudos realizados no cerebelo de rato *in vivo*, medindo a autofluorescência de flavoproteínas, verificou-se que os sinais de autofluorescência são provavelmente provenientes de atividade mitocondrial, mais concretamente da oxidação e posterior redução dos compostos NADH e FADH₂ (Shuttleworth 2010) (Kosterin, et al. 2005).

Ainda segundo Kosterin, *et al.* (2005), o cálcio que entra no terminal pré-sináptico através de canais de cálcio dependentes do potencial, após uma estimulação, pode estar relacionado com a intensidade de autofluorescência emitida.

2.4 Plasticidade sináptica e potenciação de longa duração

A potenciação de longa duração é definida como uma melhoria a longo prazo da eficácia da comunicação entre neurónios (plasticidade sináptica). Esta situação pode ser obtida através de uma estimulação, elétrica ou química, intensa. Esta pode ser realizada experimentalmente, aplicando vários pulsos elétricos seguidos, de alta frequência (tétanos), consistindo normalmente em estimulações de 100 Hz, durante 1 segundo. As mudanças sinápticas observadas nas dendrites basais demonstram um aumento do potencial pós-sináptico excitatório. Considera-se que esta forma de plasticidade sináptica está na base de processos como a aprendizagem e da formação de memórias (A. Córdoba-Montoya, Albert e López-Martín 2010).

A LTP pode ser de vários tipos dependendo da área do cérebro em que ocorre e de outros fatores. No entanto, podem-se destacar duas formas distintas de LTP induzidas eletricamente: a LTP que é dependente da ativação dos recetores pós-sinápticos de glutamato que são ativados por NMDA. Esta forma de LTP pode ser observada nas sinapses entre as fibras colaterais de *Schaffer* e as células piramidais CA1 do hipocampo, sendo que também já sido observadas nas sinapses entre as fibras associacionais-comissurais e as células piramidais da área CA3 do hipocampo. Relativamente à segunda forma de LTP, esta não depende da ativação dos recetores de NMDA. A ocorrência desta foi observada nas sinapses entre fibras musgosas e as células piramidais da área CA3 do hipocampo (Matias 2001) (F. Cooke e V. P. Bliss 2006).

No entanto, também se pode induzir a LTP quimicamente, como por exemplo, através da aplicação do bloqueador de canais de K^+ dependentes do potencial, TEA (tetraetilamónio). Esta LTP é dependente da ativação dos canais de cálcio dependentes do potencial (*voltage dependente calcium channels*, VDCCs) e foi observada na área CA1 e na fascia dentada. Contudo, recentemente, foi observada esta forma de LTP na área CA3 do hipocampo, sendo a sua indução nas sinapses das fibras musgosas dependente da ativação de VDCCs sensíveis ao Ni^{2+} (Suzuki e Okada 2007).

Por outro lado, foi concluído que nas sinapses das musgosas, os canais responsáveis pela entrega de cálcio na zona pós-sináptica são os VDCCs tipo T (Suzuki e Okada 2008).

2.5 O zinco no sistema nervoso central

O zinco é o segundo elemento metálico mais abundante no nosso organismo, a seguir ao ferro e pode ter muitas funções, das quais se podem destacar, alguns processos celulares, como por exemplo, a regulação de genes e de neurotransmissores e a ativação de metaloproteínas. No entanto, sabe-se que ele também pode estar envolvido em algumas doenças neurológicas graves (W. Choi e Y. Koh 1998).

O Zn^{2+} é um catião metálico que pode ser encontrado no cérebro de mamíferos, mais concretamente em vesículas dos nervos pré-sinápticos de sinapses específicas (glutamatérgicas), sendo co-libertado com o neurotransmissor glutamato (K. Ketterman e V. Li 2007) (Quinta-Ferreira, Dionísio, et al. 2004). No sistema nervoso central, principalmente nos terminais das fibras musgosas do hipocampo, existem elevadas quantidades de zinco nas vesículas (Quinta-Ferreira, Dionísio, et al. 2004).

A exocitose vesicular destes catiões foi observada a partir de medições de fluorescência. Durante a atividade neuronal induzida (despolarização da membrana) e após a exocitose pré-sináptica, o valor da intensidade de fluorescência, medida com um indicador de zinco que entra nas vesículas sinápticas, decresce. No entanto, após o estímulo ela regressa ao valor inicial. A libertação de Zn^{2+} é dependente da entrada do ião Ca^{2+} para a região pré-sináptica (Quinta-Ferreira, Dionísio, et al. 2004) (K. Ketterman e V. Li 2007).

O zinco vesicular parece atuar como modulador dos recetores pós-sinápticos de glutamato, ionotrópicos e metabotrópicos. Este pode facilitar uma resposta excitatória, pois inibe os recetores de GABA, reduzindo desta forma a resposta inibitória. No entanto, também pode funcionar como inibidor, pois verificou-se que ele inibe os recetores de NMDA e de canais de cálcio dependentes de potencial. Verificou-se também que o zinco potencia a resposta dos recetores de AMPA (Quinta-Ferreira, Dionísio, et al. 2004) (R. Morris e W. Levenson 2012).

A maior parte do Zn^{2+} possui ligações fortes como é o caso do zinco extracelular e intracelular, no entanto, existe algum zinco que está presente nos neurónios glutamatérgicos

pré-sinápticos que possui ligações fracas ou está livre. Este, pode ser libertado em quantidades micromolares, após estimulação intensa ou na sequência de um estímulo elétrico individual (B. Thompson, et al. 2002).

Sabe-se que a concentração do íon zinco extracelular no cérebro é normalmente inferior a 500 nM. Já dentro das vesículas dos terminais pré-sinápticos as concentrações podem rondar os 100 a 300 μ M (H. Weiss, L. Sensi e Y. Koh 2000).

Em concentrações mais altas, o zinco parece ter um comportamento neurotóxico. Ele pode provocar algumas doenças neurodegenerativas tais como a, esclerose amiot lateral, e as doenças de Alzheimer e Parkinson. O excesso de zinco causado por isquemia origina lesões traumáticas no cérebro e convulsões (R. Morris e W. Levenson 2012).

A deficiência na concentração de zinco no organismo pode levar a irregularidades no crescimento, na maturação sexual, na função imunitária e na função neurológica. É de referir que também podem ocorrer anomalias na pele e no cabelo, bem como na cicatrização de ferimentos (W. Choi e Y. Koh 1998).

Há zinco em abundância na área CA3 do hipocampo, mais concretamente nos terminais pré-sinápticos das fibras musgosas. Este zinco pode estar envolvido na LTP, pois após estimulação destas fibras ocorre a libertação de zinco que irá interacionar com os recetores excitatórios de aminoácidos como o glutamato e o GABA e com VDCCs (Xie e G. Smart 1994).

2.6 O ácido oleico na amêndoa e no azeite

A amêndoa é uma semente, normalmente considerada um fruto seco, e é um alimento bastante nutritivo. É constituída por uma pele fina, de cor acastanhada, e tem o interior creme.

Hoje em dia, um produto em voga proveniente da amêndoa é o leite de amêndoa. Este é um produto bastante atrativo a nível nutritivo e é um forte candidato a substituto do leite tradicional que é proveniente de origem animal. A produção do leite de amêndoa a nível industrial usa grandes quantidades de água e produz efluentes bastante concentrados em substâncias químicas características da amêndoa.

Um dos compostos que se pode destacar em maior quantidade, além das proteínas, são os ácidos gordos monoinsaturados, como o ácido oleico, e polinsaturados, como o ácido linoleico. A composição da amêndoa é apresentada com maior detalhe na Tabela 7, no Anexo A.

O ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$), Figura 5, é um lípido que está presente em bastantes animais, em gorduras e óleos vegetais. Mais concretamente, pode-se destacar, por exemplo, no azeite, no óleo de girassol, no óleo de palma e em animais marinhos como o bacalhau ou o tubarão.

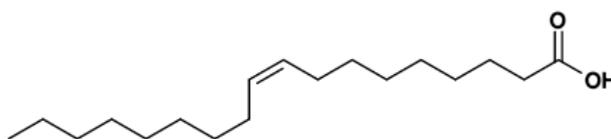


Figura 5 - Estrutura química do ácido oleico.

Quanto aos benefícios do ácido oleico sabe-se que este é bom na redução da pressão sanguínea pois permite a sinalização dos recetores adrenérgicos (Terés, et al. 2008); previne colites ulcerativas (inflamação do cólon) (S.A. de Silva, et al. 2013); protege as membranas celulares de radicais livres, pois uma vez que é menos suscetível à oxidação que outros ácidos gordos (ómega 3 e ómega 6), este pode parcialmente substituí-los tanto nos trigliceróis como nos lípidos da membrana (Haug, T. Høstmark e M. Harstad 2007); facilita a oxidação de gorduras no organismo através da estimulação da via proteína-quinase A e da ativação do complexo transcricional SIRT1/PGC1 α (Lim, et al. 2013); alivia diabetes do tipo 2, pois este pode reverter o efeito inibitório da citocina inflamatória TNF- α (K. Vassiliou, et al. 2009).

Relativamente ao ácido oleico no sistema neuronal, foi demonstrado que este pode ativar a proteína-quinase C na ausência de Ca^{2+} e de fosfolípidos. A proteína-quinase C é uma importante enzima na mediação da sinalização transmembranar (Murakami e Routtenberg 1985). Sabe-se também que a ativação da proteína-quinase C pode estar envolvida na formação da potenciação de longa duração (LTP) (J. Linden e Routtenberg 1989).

Quanto ao azeite, um alimento tipicamente mediterrânico, este é um óleo proveniente da azeitona. A produção do azeite consiste, resumidamente, na moagem das azeitonas e na extração do óleo resultante, por vias químicas e mecânicas. Relativamente à saúde, este apresenta inúmeros benefícios. Destes, podem-se destacar a perda de peso, a redução das gorduras da barriga, diminuição do risco de ataque de coração e redução do colesterol “mau”.

Este apresenta a composição mais detalhada, na Tabela 8, no Anexo A. O ácido oleico presente no azeite constitui mais de 70% da sua composição (71 g em cada 100 g), sendo deste modo, o componente com maior relevância neste alimento.

No que toca aos efluentes resultantes da produção do azeite, sabe-se que estes contêm cerca de 0,02% a 1% de lípidos. O ácido oleico (ácido gordo de cadeia longa) é uma das substâncias que, quando presente nestes efluentes, traz alguns problemas no seu tratamento por via anaeróbia (Azabou, et al. 2004). No processo de tratamento, foi verificado que o ácido oleico presente a partir de concentrações iguais ou superiores a 5 mM é tóxico para as bactérias metanogénicas (Beccari, et al. 1995). Além disso, se este não for removido, provoca uma acidez superior aos limites impostos para o consumo humano (Elkacmi, et al. 2015).

Quanto aos benefícios do ácido oleico proveniente do azeite, na saúde, A. Menendez *et al.* (2005, 2006) afirma que o ácido oleico suprime a superexpressão da Her-2/Neu. Este irá interagir sinergeticamente com o imunoterapeuta, anti-Her-2/Neu, que, por sua vez, promoverá a morte das células cancerígenas da mama. Ainda dentro da temática do cancro, outro estudo, Llor *et al.* (2003), indica que o ácido oleico proveniente do azeite induz a apoptose e a diferenciação celular. Tais efeitos levam a uma influência crucial nos processos responsáveis pelo desenvolvimento do cancro colorectal.

Relativamente ao colesterol, foi demonstrado que o ácido oleico é eficaz a baixar os níveis do colesterol LDL e do colesterol total (L. Harwooda e Yaqoobb 2002).

Atualmente, o ácido oleico é bastante usado em sabonetes devido à sua componente lubrificante. É também usado em cremes e emulsões cosméticas, normalmente de forma a repor a oleosidade de peles secas. Devido à sua capacidade de proteção e regeneração da pele afetada por queimaduras solares, este é usado também em protetores solares e bronzeadores.

3. Estado de Arte

Neste capítulo é feita uma revisão bibliográfica das variadas temáticas abordadas neste trabalho.

3.1 A LTP no hipocampo

Para que a LTP aconteça é essencial a ativação dos recetores de glutamato ionotrópicos, NMDA e AMPA. Há também evidências que os recetores de glutamato, mGluRs, também poderão estar envolvidos (I. Bashir, et al. 1993).

De modo a induzir a LTP é necessário aumentar o fluxo de cálcio intracelular. Tal acontecimento pode ser alcançado através da ativação sináptica dos recetores de NMDA ao mesmo tempo que se dá a despolarização pós-sináptica (Huang e C. Malenka 1993). Este tipo de indução pode ser realizado a partir de estímulos elétricos de alta frequência e ser observado nas áreas CA1 e na fascia dentada.

Outra forma de indução da LTP pode ser conseguido sem a ativação dos recetores de NMDA. Neste caso, o fluxo de cálcio ocorre através de canais de cálcio dependentes do potencial (VDCCs), localizados nas sinapses das fibras musgosas, nas células piramidais da área CA3 do hipocampo (Matias 2001).

É também possível induzir a LTP, independente da ativação dos recetores de NMDA, quimicamente, adicionando TEA à solução de ACSF. Isto origina bloqueio de canais de K^+ dependentes do potencial provocando a entrada de cálcio através de canais de cálcio dependentes do potencial (VDCCs). Foi possível verificar que, o TEA é de facto um indutor da LTP, dado que foi demonstrado que um antagonista (D-APV) do recetor NMDA falhou no bloqueio da LTP induzida por TEA (Song, et al. 2001).

No entanto, devido à abundância de zinco nas vesículas pré-sinápticas e à sua interação com os recetores de NMDA, verificou-se que após a estimulação o zinco libertado inibe transmissão sináptica bem como suprime/diminui a LTP. Foi também sugerido que patologias

relacionadas com o aumento do zinco extracelular poderão ter implicações na plasticidade sináptica (Xie e G. Smart 1994).

Na tabela 1, são apresentados diversos métodos/compostos e os seus efeitos na LTP.

Tabela 1 - Efeito de certos métodos/compostos na LTP.

Composto/Método	Indução	Efeito na LTP	Resultados	Referência
Estimulação tetânica	Dois impulsos separados por 50 ms e dois tétanos (100 Hz, 1s)	Indução	Estudo realizado na área CA3, nas fibras musgosas. Verificou-se que o cálcio pré-sináptico não aumenta durante a LTP.	(Matias 2001)
Estimulação tetânica	Dois tétanos (100 Hz, 1 s) separados por um intervalo de 30 ms	Indução	Estudo realizado na área CA3, nas fibras musgosas. Observou-se que a libertação de zinco endógeno poderá não ter influência na formação da LTP.	(Quinta-Ferreira e Matias 2005)
Zinco	100-300 μ M	Inibitório	Foi demonstrado	(Xie e G. Smart 1994)

			<p>que o aumento de zinco extracelular nas áreas CA1 e CA3 pode reduzir a transmissão sináptica excitatória e inibir a LTP. É também referido que níveis altos de zinco endógeno associados com patologias poderão ter implicações na plasticidade sináptica da área CA3.</p>	
Zinco	100 µM	Inibe	<p>É demonstrado que o zinco diminui a resposta dos recetores de NMDA de 40-50% e inibe a LTP nas áreas CA1 e CA3, em fatias do hipocampo.</p>	<p>(Izumi, P. Auberson e F. Zorumski 2006)</p>

Ifenprodil (antagonista dos recetores de NMDA NR1/NR2B)	10 μ M	Nenhuma	Não interfere na LTP.	(Izumi, P. Auberson e F. Zorumski 2006)
APV + Ifenprodil APV + zinco	10 μ M cada 10 μ M cada	Nenhuma	Não interferem na LTP apesar de provocarem uma inibição superior a de 50% nos recetores NMDA.	(Izumi, P. Auberson e F. Zorumski 2006)
NPV-AAM077 (antagonista dos recetores NR1/NR2B com relativa seletividade a baixas concentrações)	0.05 μ M	Nenhuma	Bloqueia até ~50% os recetores NMDA, mas não influencia a LTP.	(Izumi, P. Auberson e F. Zorumski 2006)
TEA	25 mM	Indução	Induz a LTP na área CA1.	(Song, et al. 2001)
TEA	25 mM	Indução	Induz a LTP nas áreas CA1 e CA3.	(Stewart, et al. 2005) (Suzuki e Okada 2008)

3.2 O zinco no hipocampo

O zinco é essencial no nosso organismo, pois está presente na estrutura de variadas proteínas e é responsável por determinadas funções destas, tais como, regulatórias, enzimáticas e estruturais. No sistema nervoso central, o zinco pode atuar como um agente neurosecretor (R. Morris e W. Levenson 2012).

Existe muito zinco nas vesículas de terminais nervosos excitatórios podendo a sua libertação em grandes quantidades estar relacionada com lesões neuronais após convulsões prolongadas ou isquemia (M. T. Canzoniero, L. Sensi e W. Choi 1997).

O Zn^{2+} é também um modulador dos recetores de aminoácidos, onde atua como inibidor dos recetores de NMDA e potencia os recetores de AMPA. Além disso, o Zn^{2+} pode influenciar diretamente vários sinais em cascata, uma vez que ele pode passar através dos canais de recetores de NMDA, de recetores AMPA/kainato permeáveis ao Ca^{2+} e de canais de Ca^{2+} dependentes do potencial (VDCCs) existentes nos neurónios pós-sinápticos (Li, et al. 2011).

Para conhecer o papel do zinco em funções cerebrais, e na atividade sináptica em particular, podem-se usar indicadores permeantes, que formam compostos fluorescentes com o zinco intracelular.

Na Tabela 2 é feita uma revisão bibliográfica sobre alguns dos indicadores de zinco mais usados.

Tabela 2 - Resultados para diferentes indicadores de zinco

Indicador	Concentração	Resultados	Referências
Zinpyr-1	20 μ M	O estudo foi realizado nas fibras musgosas do hipocampo. Foi induzida uma despolarização na camada <i>stratum</i>	(K. Ketterman e V. Li 2007)

		<p><i>lucidum</i> da área CA3, durante atividade neuronal. Observou-se uma diminuição da intensidade de fluorescência, quando ocorreu a liberação de zinco pré-sináptico.</p>	
Mag-fura-5	$K_d (Ca^{2+}) = 20 \mu M$ $K_d (Mg^{2+}) = 2.6 mM$	<p>Nas células neuronais e na ausência de Mg^{2+} e Ca^{2+} extracelular, a variação de Zn^{2+} após a exposição a $100 \mu M$ de glutamato mais $100 \mu M$ de Zn^{2+} foi de 40 a 50 nM.</p>	(M. T. Canzoniero, L. Sensi e W. Choi 1997)
Mag-fura-5	3 μM	<p>Em neurónios de cultura foram adicionados zinco extracelular em concentrações neurotóxicas (300 μM) e KCl (30-90 mM) para causar uma despolarização. Verificou-se um aumento na concentração do zinco intracelular.</p>	(L. Sensi, et al. 1997)

TSQ	30 μ M	O estudo foi realizado no hipocampo, nas sinapses das fibras musgosas, em células piramidais da área CA3. Verificou-se uma alteração na fluorescência correspondente a sinais de zinco pré-sináptico.	(Quinta-Ferreira, Dionísio, et al. 2004)
TSQ	0.001% (w/v)	Resultados obtidos numa cultura de neurónios da zona cortical, onde não existia Zn^{2+} exógeno. A exposição dos neurónios, durante 1 min, a um aumento da concentração de Zn^{2+} (1-100 μ M), levou a um aumento gradual da fluorescência de TSQ.	(Marin, et al. 1999)
FluoZin-3	1 μ M	Estudo realizado nas sinapses das fibras musgosas do hipocampo de ratos. Verificou-se a origem vesicular do	(Qian e L. Noebels 2005)

		zinc tendoem conta a ação do transportador de zinco vesicular ZnT3.	
Newport Green	20 μ M	Foi aplicada uma estimulação elétrica em fatias do hipocampo, nas sinapses das fibras musgosas. Observou-se libertação de Zn^{2+} dos neurónios pré-sinápticos.	(Li, et al. 2011)
Newpor Green diacetato (DCF)	10 μ M	Simulou-se uma situação de isquemia, privando as fatias de glucose e oxigénio durante 30 min. O estudo foi realizado no hipocampo de ratos, na área CA1. Verificou-se um aumento na acumulação de Zn^{2+} intracelular.	(J. Stork e V. Li 2006)
Newport Green diacetato (DCF)	5 μ M	Observou-se a distribuição do Zn^{2+} intracelular. Após uma despolarização, induzida por KCl, verificou-se um	(Redenti , Ripps e L. Chappell 2007)

aumento da fluorescência nos terminais sinápticos.

Os agentes quelantes metálicos são compostos químicos que apresentam grande afinidade com alguns íons metálicos. Sabe-se que estas substâncias que formam complexos com o zinco poderão diminuir algumas das neuropatologias causadas pelo excesso de zinco intracelular (P. Cuajungco e J. Lees 1998) (Lavoie, et al. 2006).

Estas substâncias podem também ser usadas para testar o papel do zinco durante a atividade neuronal. Uma forma de verificar que são sinais de zinco é observando a diminuição dos sinais de fluorescência na presença de um quelantes de zinco.

Na Tabela 3 são apresentados alguns quelantes e os seus efeitos.

Tabela 3 – Estudos realizados para diferentes quelantes de zinco e os seus efeitos.

Quelante	Concentração	Resultados	Referência
TPEN	5mg/kg	Foi verificado que apesar de não proteger da neurodegeneração reduz a neurogênese e a proliferação das células progenitoras provocada por convulsões.	(Kim, et al. 2012)
CQ	30 mg/kg	Este quelante foi injetado na zona intraperitoneal de modo a reduzir a quantidade de zinco no cérebro. Verificou-se que a	(Kim, et al. 2012)

		neurogênese provocada pelas convulsões era reduzida.	
EDPA	250 μ M	Conclui-se que os	(Lavoie, et al.
Ca-EDTA	10 mM	quelantes de zinco	2006)
Cu-EDTA	10 mM	permeantes (DEDTC,	
Zn-EDTA	10 mM	TPEN) e os	
Tricina	1 mM	impermeantes (Ca-	
TPEN	1 μ M	EDTA, EDPA e	
DEDTC	200 μ M	tricina) na membrana	
		não impedem uma	
		possível acumulação	
		letal de zinco em	
		neurónios afetados	
		por episódios	
		epiléticos. Os	
		quelantes	
		intracelulares de	
		zinco podem afetar	
		também a	
		excitabilidade	
		neuronal e a	
		acumulação de zinco	
		na sequência de	
		convulsões	
		induzidas.	
Ca-EDTA	300 mM	Em aplicações de Ca-	(Calderone, et al.
		EDTA em animais,	2004)
		antes e após	

episódios de isquemia, observou-se que entre 50% a 75% da amostra mostrava uma resposta eficaz na proteção dos neurónios da área CA1. A aplicação de Ca-EDTA, antecipadamente, atenua a isquemia induzida, promove a regulação proteíca e atrasa o aumento do Zn^{2+} e da morte neuronal.

Os bloqueadores de recetores (antagonistas) permitem verificar a origem dos sinais de zinco. Quando eles se ligam a recetores de glutamato os recetores são bloqueados impedindo a passagem do zinco através deles. Um agonista tem o efeito contrário, ou seja, após a ligação ao recetor, este é ativado abrindo-se o canal iónico.

Na Tabela 4 são apresentados diversos antagonistas/agonistas de recetores e os seus alvos.

Tabela 4 - Alguns tipos de antagonistas e agonistas.

Composto	Efeito	Recetores	Concentração	Referência
DCG-IV	Agonista	mGluR	1 μ M	(Quinta-Ferreira,
CNQX	Antagonista	AMPA	10 μ M	Dionísio, et
D-APV	Antagonista	NMDA	50 μ M	al. 2004)

3.3 O efeito na saúde dos compostos da amêndoa

Atualmente existem muitos estudos acerca da composição da amêndoa bem como das suas propriedades. Estas são um fruto com uma composição muito variada e que apresenta inúmeros benefícios para a saúde.

Este fruto seco é especialmente rico em compostos gordos insaturados e bioativos (Ros 2010). Existem estudos que demonstram que o consumo da amêndoa pode reduzir as doenças coronárias do coração (J.A. Jenkins, et al. 2002) e os diabetes (J. A. Jenkins , et al. 2006) . Ele também produz a diminuição do efeito do colesterol e efeitos benéficos no stresse oxidativo, em inflamações e na reatividade vascular (A. Trautwein e Demonty 2007) .

Relativamente à nutrição dietética sabe-se que este fruto não só permite manter um peso estável, como também, o seu consumo a longo prazo pode levar à redução do peso (Kiefer 2007).

Na Tabela 5 são apresentados os efeitos que os compostos presentes na amêndoa provocam na saúde.

Tabela 5 - Efeitos na saúde provocados por compostos da amêndoa.

Compostos	Resultados	Referências
Arginina	Origina uma melhor resposta vascular. Em testes realizados tanto em humanos como em animais com alguma forma de hipertensão, foram obtidos resultados que indicam a redução da pressão arterial após a ingestão de arginina.	(Gokce 2004)
Vitamina E, Flavonóides, Compostos fenólicos, Ácidos monosaturados	É observada uma elevada resistência à oxidação da lipoproteína colesterol de	(Chen, Lapsley e Blumbe 2006) (J.A. Jenkins, et al. 2002)

baixa densidade (LDL-C), com o consumo de 36,5 g a 73 g de amêndoas. Deste modo, há um maior grau de prevenção e diminuição do risco das doenças coronárias de coração.

Fitoesteróis

Após a ingestão de fitoesteróis é induzido o fluxo biliar que faz com que haja a libertação de colesterol no organismo. A semelhança destas duas moléculas (fitoesterol e colesterol) faz com que haja uma competição entre elas, levando assim há redução do colesterol no organismo.

(A. Trautwein e Demonty 2007)

Foi observado, que tanto o colesterol como os fitoesteróis usam o mesmo transportador na corrente sanguínea. Deste modo, é reduzida a absorção do colesterol.

Os fitoesteróis (β -sitosterol) podem ter propriedades anti-inflamatórias. Em estudos *in vitro* foi observada uma inibição da secreção de marcadores como IL-6 e TNF- α . Também em ratos

	asmáticos com inflamação pulmonar, e após a ingestão por injeção intra-peritoneal, foi observada uma redução desta inflamação.	
Fibras	Encontrou-se evidência a favor da ideia que fibras funcionam como supressor do apetite. Estas influenciam a produção das hormonas responsáveis pelo apetite levando assim a uma redução do mesmo.	(Kiefer 2007)
Cálcio, Magnésio e Potássio	O alto consumo destas substâncias leva a uma maior proteção da desmineralização dos ossos, da hipertensão arterial, da resistência à insulina e a um menor risco de doenças cardiovasculares.	(Ros 2010)
Ácidos gordos polinsaturados (PUFAs)	Reduzem a excitabilidade da membrana cardíaca e impedem a arritmia cardíaca.	(Xiao e Li 1999)

3.4 O efeito na saúde dos compostos do azeite

O azeite representa um dos alimentos característicos da dieta mediterrânea. Além disso, representa também uma grande fatia da economia de alguns países produtores do Mediterrâneo.

Apesar do ácido oleico ser um dos principais constituintes do azeite, outros componentes com grande relevância são os compostos fenólicos. Estes atuam principalmente como antioxidantes naturais, que podem levar à prevenção de algumas doenças humanas (Lesage-Meessena, et al. 2001).

Na Tabela 6 são apresentados os efeitos que os compostos presentes no azeite provocam na saúde.

Tabela 6 - Efeitos na saúde de compostos do azeite.

Compostos	Resultados	Referências
Ácido linoleico e ácido linoleico-alfa (ácidos polinsaturados)	Podem ter efeitos no decréscimo de triglicerídeos e no LDL.	(Isabel Covas 2007)
Compostos fenólicos variados	Têm um elevado poder antioxidante, contra a oxidação do LDL. Além disso, foi também observado um atraso na progressão da aterosclerose (acumulação de placas de gordura nos vasos sanguíneos).	(Isabel Covas 2007)
Ácido oleico e outros (ácidos monoinsaturados)	Decréscimo da expressão de adesão molecular das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), podendo ter efeitos anti-inflamatórios específicos.	(L. Harwooda e Yaqoobb 2002)

4. Procedimentos experimentais e materiais

Nesta secção são ser apresentadas as técnicas e os métodos utilizados na realização do trabalho experimental, incluindo o equipamento utilizado para a aquisição dos sinais óticos.

4.1 Arranjo Experimental

Para a aquisição de sinais óticos foi usado um microscópio de fluorescência (Zeiss Axioscop), que está representado na Figura 6. Este contém um arranjo de transfluorescência sendo a luz emitida captada por meio uma objetiva de imersão em água (40x, N.A., 0,75), com uma distância de trabalho (*working distance*) de 1,6 mm. A fonte de luz era uma fonte de tungsténio/halogéneo (12 V, 100 W), tendo-se usado um filtro de excitação de 480 nm, com 10 nm de largura de banda e um filtro de emissão passa-alto de 500 nm que permite seleccionar luz emitida na região do visível.

Os sinais de fluorescência foram detetados usando um fotodíodo de silício (Hamamatsu, área de 1 mm²), tendo o sinal convertido por meio de um conversor analógico/digital de 16 bits (National Instruments) e os dados são processados na plataforma Signal Express ®. Para a perfusão do líquido na câmara experimental usou-se uma bomba peristáltica, Figura 7, que permitia a circulação do meio extracelular a uma velocidade constante, entre 1.5 e 2 mL/min.

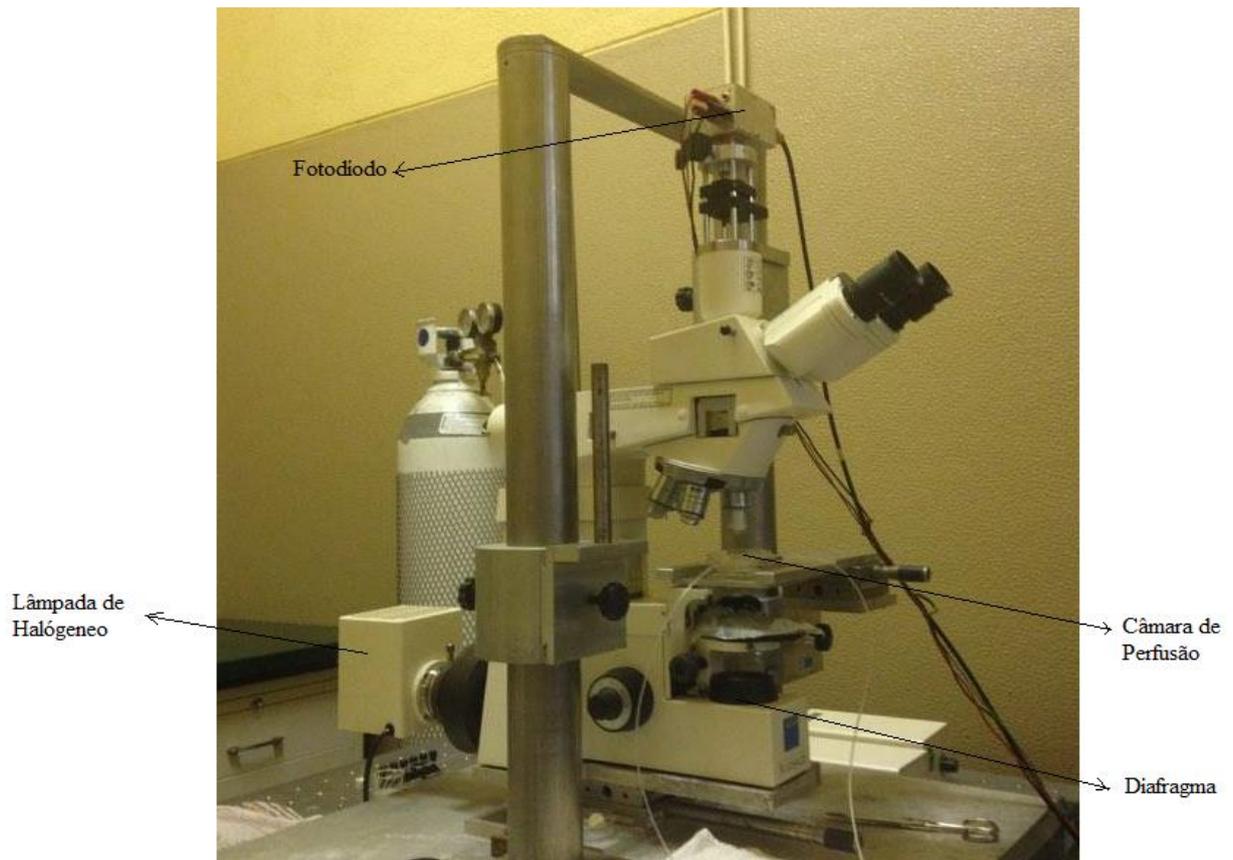


Figura 6 - Microscópio de fluorescência.

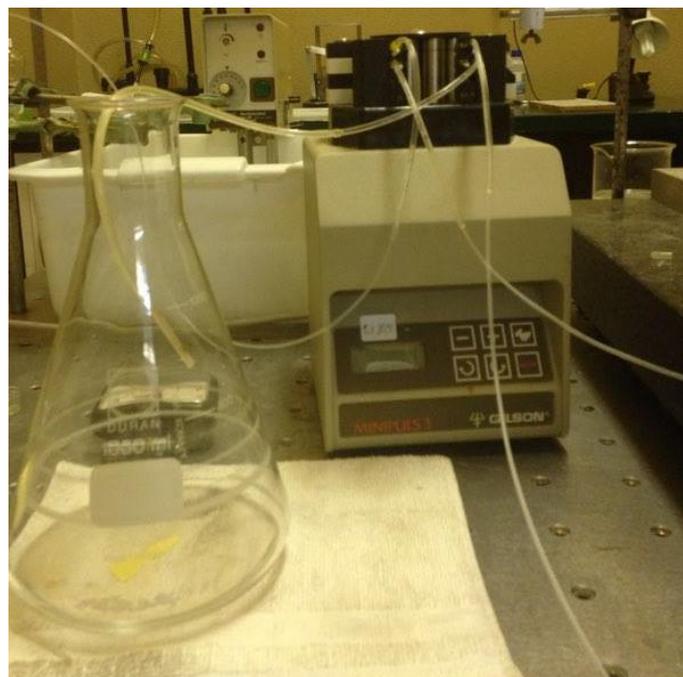


Figura 7 – Bomba peristáltica.

4.2 Preparação de fatias do hipocampo e detecção de sinais óticos

As fatias do hipocampo foram obtidas de fêmeas gestantes (16-18 dias) de ratos Wistar, com idades compreendidas entre 8 e 12 semanas. Os animais foram sujeitos a um deslocamento cervical seguido de decapitação, tendo o cérebro sido imediatamente colocado numa solução de ACSF previamente oxigenada (95% O₂, 5% CO₂) e gelada (5-8° C).

Posteriormente, o cérebro, representado na Figura 8, era colocado sobre uma caixa de *petri* gelada, com um papel de filtro previamente banhado com ACSF, separando-se os dois hemisférios cerebrais. Seguidamente isolava-se o hipocampo, colocando frequentemente durante a disseção de cada hemisfério, a solução de ACSF gelada, para evitar a morte celular.



Figura 8 - Cérebro de rato Wistar.

As fatias eram obtidas usando um instrumento com 5 lâminas paralelas, separadas de 400 µm, sendo os cortes efetuados na zona média do hipocampo.

Seguidamente, com a ajuda de um pincel fino, retiravam-se as fatias das lâminas e colocavam-se na solução de ACSF, oxigenada. Estas fatias podiam ser usadas nas experiências de autofluorescência, depois de terem estado 1 h naquele meio.

Para as experiências de zinco, as fatias eram incubadas durante 1 h, na solução de ACSF oxigenada, contendo a forma permeante do indicador fluorescente de zinco, Newport Green. Após aquele período as fatias eram transferidas para a solução de ACSF normal, oxigenada, até serem usadas numa experiência. Para este efeito as fatias eram transferidas para a câmara experimental, colocada no microscópio, sendo continuamente perfundidas pelo meio desejado, à temperatura constante de 37° C. As fatias eram colocadas como mostra a Figura 9,

de modo a que o feixe de luz incidente passasse através da área CA3 do hipocampo, na qual se encontram as sinapses das fibras musgosas.

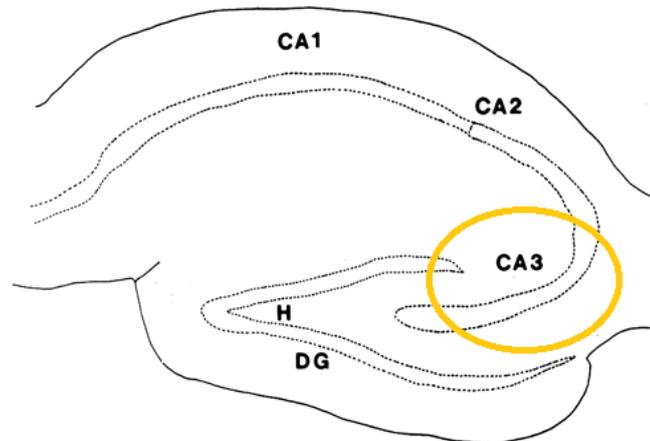


Figura 9 - Representação de uma fatia do hipocampo com indicação das suas áreas. A zona limitada pela linha cor de laranja indica a parte da área CA3 onde se fazia incidir a luz. (Adaptado de Andersen et. al. 2007)

Normalmente todas as experiências eram iniciadas com a deteção de sinais óticos de fatias banhadas em ACSF, durante 10 min. Depois mudava-se para os meios extracelulares de interesse, por um período de 30 min cada.

4.3 Medição de sinais de autofluorescência

Neste caso, não era usado nenhum tipo de indicador, uma vez que a autofluorescência é um fenómeno intrínseco do meio biológico que se pretendia estudar. Foram feitas experiências para estudar o efeito de KCl, TEA e ácido oleico em sinais de autofluorescência.

Os valores obtidos, recolhidos em volts, traduziam a intensidade de autofluorescência. Eram registados 100 dados por minuto, sendo calculada a média dos mesmos. Seguidamente, normalizaram-se estes valores médios, dividindo cada um deles pelo valor médio dos 10 pontos iniciais em ACSF, correspondendo aos primeiros 10 min, que formam a linha base.

Nos gráficos cada ponto corresponde ao valor médio normalizado dos resultados obtidos nas várias experiências \pm o desvio-padrão (s.e.m.).

4.4 Medição de sinais de zinco

Nestas experiências usou-se o indicador fluorescente de zinco Newport Green que tem uma afinidade moderada pelo zinco e uma afinidade pequena pelo cálcio. Estes factos permitem concluir que os sinais detetados são devidos a variações da concentração de zinco e não de cálcio. Pelo facto da forma permeante do indicador Newport Green que foi usada não entrar nas vesículas sinápticas, considera-se que os sinais medidos tinham uma origem pós-sináptica. A estrutura química do Newport Green está representada na Figura 10. A sua fórmula química é $C_{43}H_{30}Cl_2N_4O_8$ e tem um peso molecular de 801.638 g/mol.

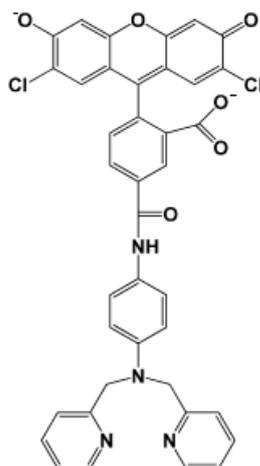


Figura 10 - Indicador de zinco (Newport Green). Adaptado de Rezaul Karim *et. al* 2015.

A Figura 11 representa o espectro de excitação do indicador Newport Green. Este indicador foi usado para investigar o efeito dos compostos TEA e ácido oleico em sinais de zinco.

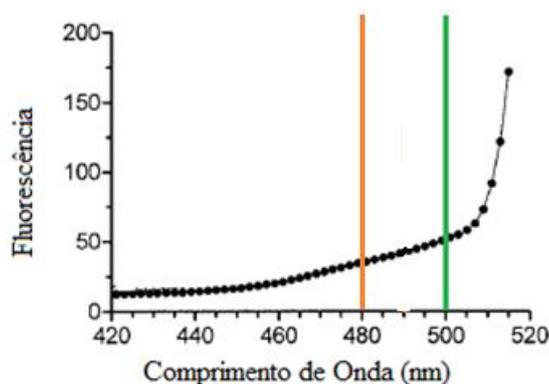


Figura 11 - Espectro de excitação do indicador Newport Green em condições de baixo zinco intracelular. As linhas verticais indicamos comprimentos de excitação (480 nm, linha laranja) e o menor comprimento de onda de emissão (500 nm, linha verde). Adpatado de E. Dineley *et. al* 2002.

Depois de recolhidos os dados, como indicado na subsecção anterior, procedeu-se à sua correção pela autofluorescência. Aquela correção foi realizada multiplicando por 0,7 os valores da linha base, de acordo com estudos anteriores, calculando o seu valor médio e subtraindo esse valor a todos os pontos recolhidos nessa experiência. Os resultados obtidos foram depois normalizados e apresentados também como indicado anteriormente, através de valores médios \pm o desvio-padrão (s.e.m.).

4.5 Preparação de soluções

Neste subcapítulo, são apresentados os modos de preparação das diversas soluções usadas ao longo deste trabalho. É de referir, que, para a preparação das soluções foi usada água ultra pura do sistema: Direct Pure Water Sistem UP 10, da Interlab. A resistividade da água é de 18,2 M Ω .cm

Solução de ACSF normal: solução cerebrospinal artificial que imita o meio extracelular, constituída pelos seguintes compostos: 124 mM de NaCl; 24 mM de NaHCO₃; 10 mM de D-glucose (C₆H₁₂O₆); 3,5 mM de KCl; 2 mM de MgCl₂.6H₂O; 1,25 mM de

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 2 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4. No fim, procedeu-se à oxigenação (95 % O_2 , 5 % CO_2) da solução, durante 10 min.

Solução de KCl (20 mM, hiperosmótica): solução constituída pela seguinte mistura: 124 mM de NaCl; 24 mM de NaHCO_3 ; 10 mM de D-glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$); 2 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,25 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 2 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4. Adicionaram-se ainda mais 20 mM KCl, ficando a solução com 23,5 mM deste composto. No fim, procedeu-se à oxigenação (95 % O_2 , 5 % CO_2) da solução, durante 10 minutos.

Solução de KCl (20 mM, osmolaridade normal): solução formada pela seguinte mistura: 24 mM de NaHCO_3 ; 10 mM de D-glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$); 2 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,25 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 2 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Quanto ao KCl são adicionados 20 mM, ficando este com 23,5 mM e são retirados 20 mM de NaCl ficando este com 104 mM, pH 7,4. No fim, como era habitual, procedeu-se à oxigenação (95 % O_2 , 5 % CO_2) da solução, durante 10 minutos.

Solução de TEA (25 mM): esta solução de TEA foi preparada adicionando os compostos referidos para a produção de ACSF normal, tendo sido alteradas as concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e do KCl, para 10 mM e 5 mM, respetivamente. Adicionou-se também TEA, numa concentração de 25 mM. Antes de se adicionar $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, verificou-se o valor do pH, sendo este ajustado para 7,3. No final oxigenou-se a solução durante 10 min.

Solução de TEA (25 mM) + tobultamida (250 μM): solução preparada adicionando tobultamida à solução de TEA, previamente preparada. Para o efeito, retirou-se 0,5 mL de uma solução *stock* de tobultamida (50 mM) e adicionou-se à solução de TEA.

Solução de Ca-EDTA (25 mM): Para preparar a solução *stock* de Ca-EDTA, dissolveram-se 4,6785 g de Ca-EDTA em água ultra pura. Seguidamente, num balão volumétrico de 100 mL, adicionaram-se 1 ml de KCl e 1 ml de Ca-EDTA, da solução previamente preparada, perfazendo o resto com ACSF.

Solução de Newport Green (5 μ M): Para preparar esta solução, foi primeiramente feita uma solução *stock* (5 mM) dissolvendo 1 mg de Newport Green em em 0,25 mL de DMSO. A solução final foi feita adicionando 5 μ L da solução *stock* a 5 mL de ACSF.

Solução de ácido oleico (20 μ M): preparou-se uma solução *stock* (10 mM) adicionando 4,7 μ L de ácido oleico a álcool ultra puro (100%). Para preparar a solução final, retiraram-se 100 μ L da solução *stock* para um balão volumétrico de 50 mL. O restante volume foi perfeito com solução de ACSF (Xiao e Li 1999).

Soluções dos bloqueadores:

Solução de NBQX (10 μ M): Dissolveram-se 5 mg de NBQX em 1,3 mL de água ultra pura para preparar a solução *stock* (10 mM). Adicionaram-se 50 μ L desta solução a 50 mL da solução de ACSF.

Solução de Nifedipina (10 μ M): Dissolveram-se 5 mg de nifedipina em 1,5 mL de DMSO para preparar a solução *stock* (10 mM). Adicionaram-se 50 μ L desta solução a 50 mL de ACSF.

4.6 Produtos químicos utilizados

Ácido oleico, NaCl, D-Glucose, NBQX, nifedipina, Ca-EDTA, TEA, tolbutamida

- Sigma Aldrich, Sintra, Portugal

KCl, NaHCO₃, NaH₂PO₄ - Merck, Lisboa, Portugal

NewPort Green DCF - Molecular Probes by Life Technologies, Carlsbad, Canadá

5. Resultados

Nesta secção, apresentam-se os resultados obtidos das experiências realizadas neste trabalho. Estas consistiram na deteção de sinais óticos, de autofluorescência e de zinco, nas sinapses das fibras musgosas da área CA3 do hipocampo. Para o registo de sinais de zinco as fatias foram incubadas com a forma permeante do indicador Newport Green. Em ambos os casos a preparação era iluminada com luz visível, com um comprimento de onda de 480 nm, sendo a fluorescência emitida recolhida para comprimentos de onda superiores a 500 nm. Considerando as características espectrais das proteínas intrínsecas fluorescentes, NADH e FAD, e o comprimento de onda de excitação utilizado, 480 nm, conclui-se que os resultados de autofluorescência obtidos são devidos à fluorescência do FAD, flavoproteínas.

As primeiras variações de autofluorescência obtidas foram induzidas pelos compostos químicos KCl e TEA que despolarizam a membrana celular originando LTP. Depois investigou-se o efeito da aplicação do ácido oleico. Pretendia-se comparar o efeito deste ácido com os efeitos produzidos por KCl e TEA, que provocam alterações sinápticas de longa duração (LTP).

Os sinais de zinco foram, por razões idênticas, medidos na presença de TEA e de ácido oleico.

5.1 Sinais de autofluorescência

5.1.1 Comparação de sinais de autofluorescência com sinais de zinco

A Figura 12 mostra sinais de autofluorescência e de zinco, devidos à atividade espontânea das sinapses estudadas, obtidos durante a perfusão das fatias com ACSF.

Estes resultados, que foram obtidos em intervalos de 1 minuto, durante 10 minutos mostram que os sinais de zinco têm valores médios de 0,53 e que têm amplitude de cerca de $38 \pm 10\%$ superior aos sinais de autofluorescência. Isto deveu-se ao facto dos sinais registados nas fatias contendo o indicador de zinco serem resultantes da emissão de autofluorescência e

da fluorescência do composto Newport Green. É de referir também que a origem dos sinais zinco é pós-sináptica.

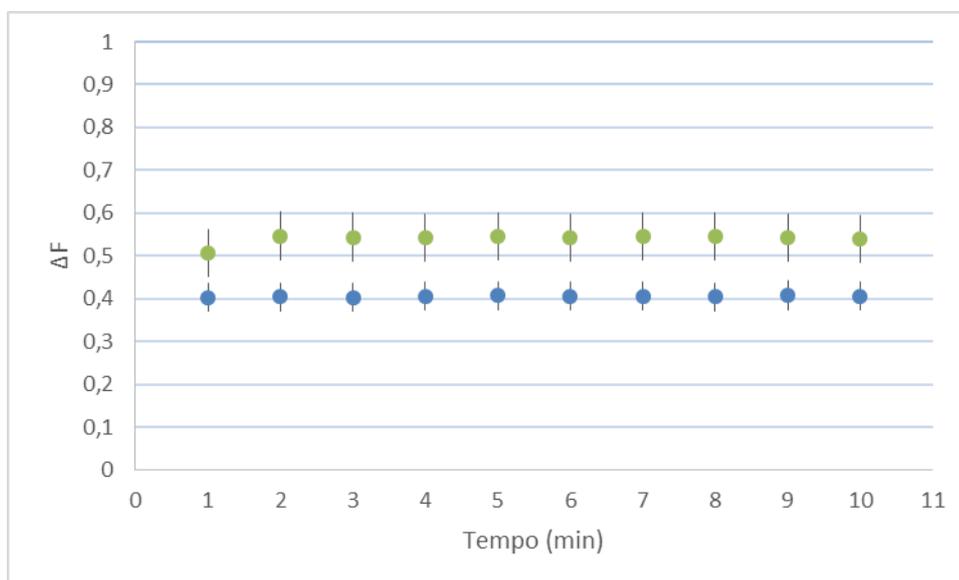


Figura 12 - Sinais de autofluorescência de fatias não incubadas (azul, n=7) e sinais de zinco obtidos de fatias incubadas com Newport Green (5 μ M) (verde, n=7). Os pontos representam a média \pm s.e.m.

5.1.2 Efeito de KCl e da osmolaridade em sinais de autofluorescência

Como se referiu anteriormente o KCl é uma substância despolarizante que altera o potencial de membrana, podendo induzir quimicamente a LTP.

Foram feitas dois tipos de experiências com meios extracelulares contendo mais 20 mM KCl. Um tinha osmolaridade normal, para o que se reduziu a concentração de NaOH de 20 mM. O outro tinha a concentração normal de NaOH, igual à do ACSF, sendo por isso um meio hiperosmótico. Em ambos os casos, após 10 min em ACSF, as fatias eram perfundidas, durante 30 min, com uma solução de KCl e depois por um período igual com ACSF.

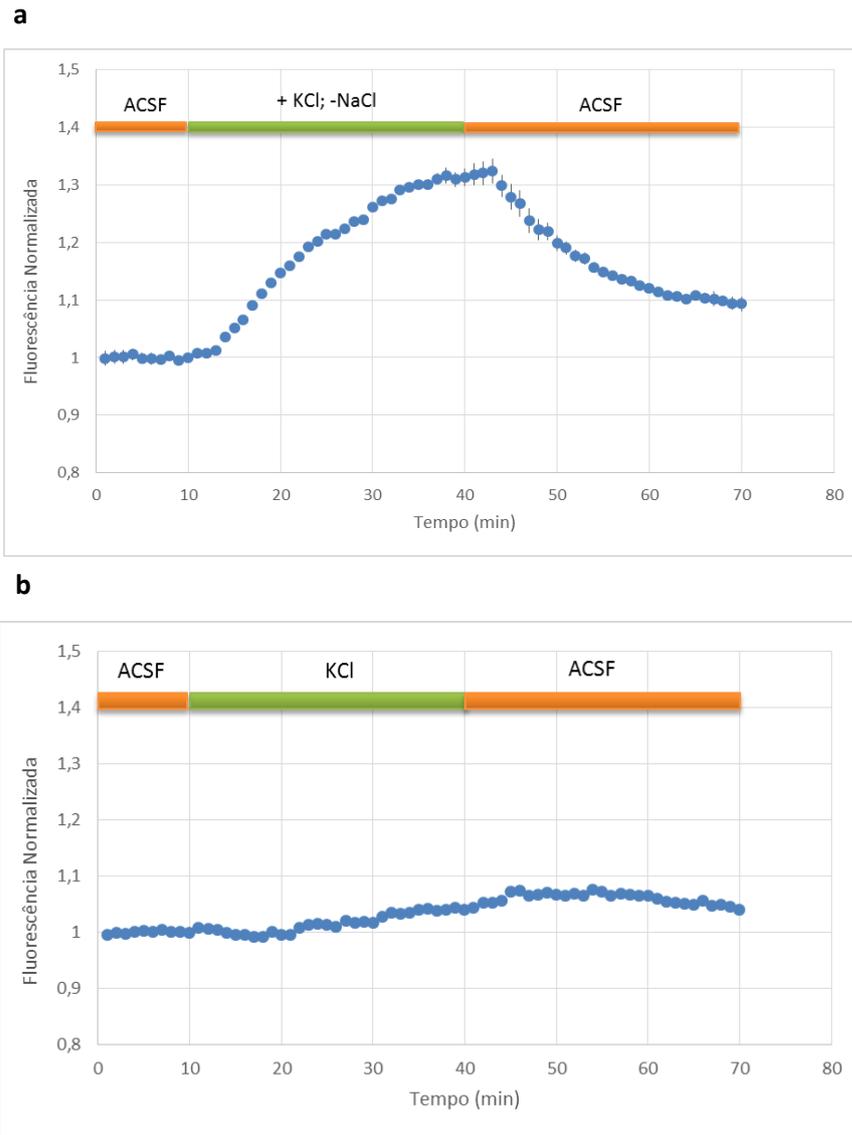


Figura 13 – Efeito do KCl nos sinais de autofluorescência. **a.** Aumento do sinal de autofluorescência na presença de KCl, numa solução ACSF com +20mM de KCl e -20 mM de NaOH (osmolaridade normal), n=3. **b.** Aumento do sinal de autofluorescência na presença de +20 mM KCl (solução hiperosmótica), n=3. Os pontos representam a média \pm s.e.m.

Observando a Figura 13, verificou-se que a intensidade dos sinais de autofluorescência produzidos são muito maiores para a solução de KCl com osmolaridade normal (Figura 13.a) do que para a solução de KCl hiperosmótica (Figura 13.b). As amplitudes nestes meios são respectivamente iguais a $31 \pm 1\%$ e $5 \pm 0,2\%$, medidas no período 35 – 40 min.

É de realçar que no meio com osmolaridade normal os sinais aumentam, ou seja, são potenciados, no entanto, não recuperam totalmente nos 30 minutos seguintes em ACSF. Já no meio hiperosmótico, depois de se retirar a solução de KCl, os sinais continuam a aumentar, estabilizando apenas 20 minutos depois de se mudar para a solução de ACSF.

5.1.3 Ação do quelante de zinco, Ca-EDTA, em sinais de autofluorescência

Para verificar se o zinco libertado na fenda sináptica afeta os sinais de autofluorescência foram adicionados 25 mM de Ca-EDTA, durante 60 minutos, após a perfusão de KCl hiperosmótico.

O Ca-EDTA é um quelante de zinco impermeante, ou seja, não entra na zona pré nem pós-sináptica, permanecendo na fenda sináptica. Sendo o EDTA um composto com uma elevada afinidade por cálcio e também por zinco utiliza-se Ca-EDTA, que é um composto saturado com cálcio, para complexar zinco. Esta saturação evita que ele se ligue ao cálcio, favorecendo assim a ligação ao zinco.

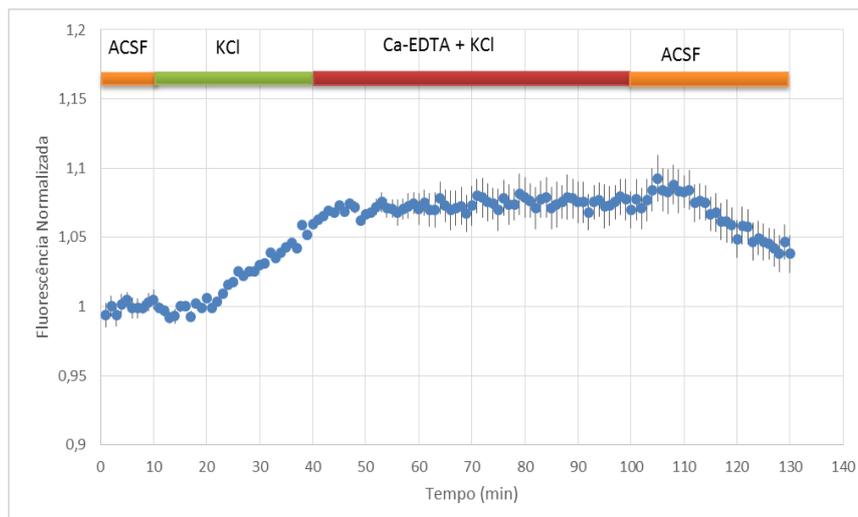


Figura 14 – Efeito do quelante de zinco Ca-EDTA, em sinais de autofluorescência, induzidos pelo meio de KCl hiperosmótico (n=3). Os pontos representam a média \pm s.e.m.

A Figura 14 mostra que após a adição de Ca-EDTA, a autofluorescência se mantém constante tendo uma amplitude de $7 \pm 1\%$, nos últimos 5 min de aplicação do composto. Após 1 hora naquele meio perfunde-se novamente ACSF que fez baixar de novo a intensidade. No entanto, durante os 30 min da sua aplicação, ela não regressou à linha base.

5.1.4 Variações de autofluorescência induzidas por TEA

Um dos objetivos do trabalho foi investigar o efeito de TEA, que é um bloqueador de canais de potássio dependentes de potencial, nos sinais de autofluorescência. Para o efeito aplicou-se, para além do TEA, o bloqueador de canais K_{ATP} , tobultamida.

No primeiro grupo de experiências perfundi-se, duas vezes a solução de TEA intercaladas com a de ACSF, durante 30 minutos cada.

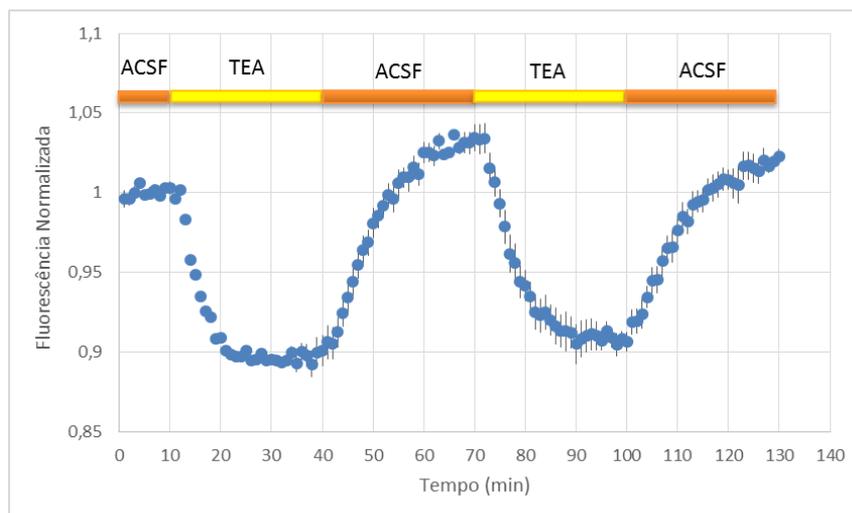


Figura 15 – Efeito de TEA, que provoca a indução química da LTP, em sinais de autofluorescência (n=4). Os pontos representam a média \pm s.e.m.

De acordo com os resultados observados na Figura 15, a perfusão da solução de TEA origina sempre uma diminuição significativa da intensidade do sinal de autofluorescência. A primeira depressão tem uma amplitude de cerca de $10,3 \pm 1\%$ do valor da linha base, representada pelos primeiros 10 pontos. A segunda tem uma amplitude um pouco menor de cerca de $9,2 \pm 1\%$.

A aplicação de ACSF entre o minuto 40 e o minuto 70 leva à recuperação do sinal que depois sobe acima da linha base a partir do minuto 52 com uma amplitude igual a $4 \pm 1\%$ superior à da linha base. Na última perfusão de ACSF o sinal atingiu de novo um valor superior ao da linha base $2 \pm 1\%$, sendo esta potenciação um pouco inferior à anterior.

5.1.5 Efeito do ácido oleico em sinais de autofluorescência

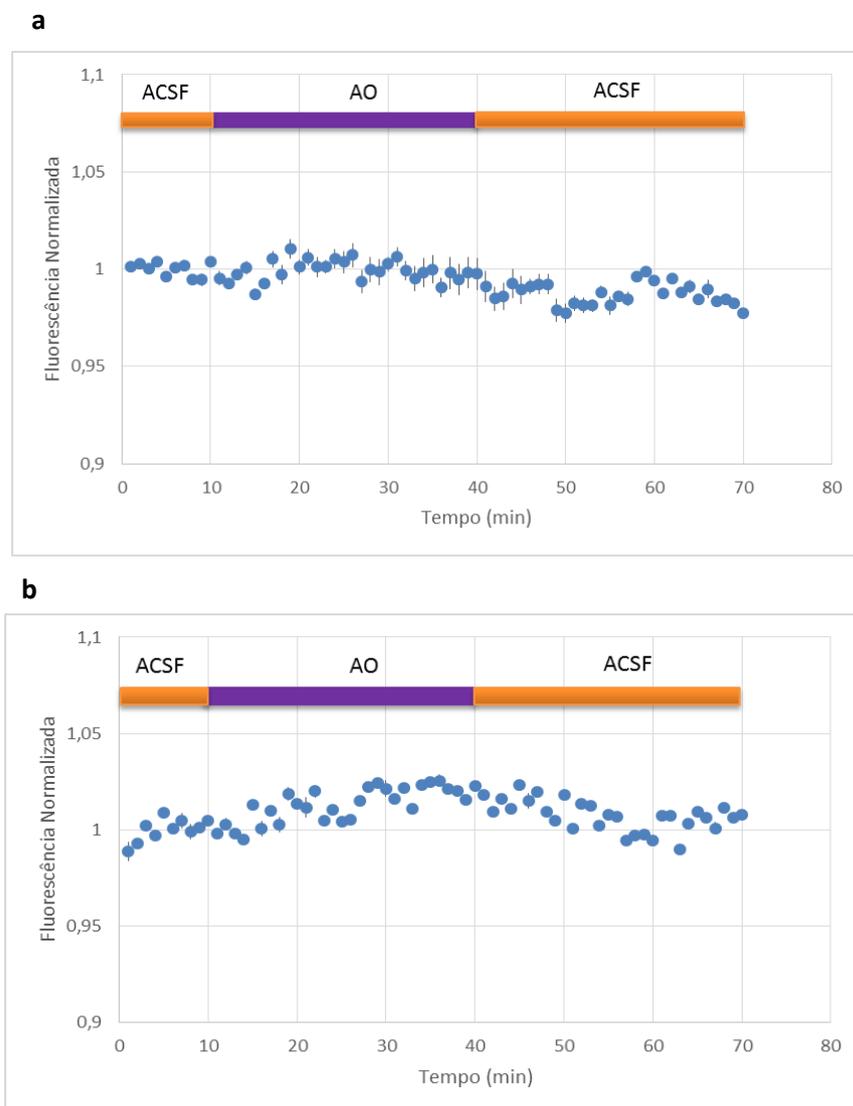


Figura 16 - Efeito do ácido oleico nos sinais de autofluorescência. **a.** Sinais obtidos para uma concentração de 20 μM de ácido oleico, $n=3$. **b.** Sinais obtidos para uma concentração de 40 μM de ácido oleico, $n=2$. Os pontos representam a média \pm s.e.m.

Para conhecer o efeito do ácido oleico em sinais de autofluorescência, foram testadas duas concentrações deste ácido em fatias do hipocampo não incubadas.

A Figura 16, mostra que para a concentração de 20 μM os sinais permaneceram aproximadamente iguais aos da linha base, descendo ligeiramente, cerca de $2,3 \pm 0,61\%$ em relação àquela linha base, após a reperfusão de ACSF. A aplicação da solução com 40 μM de

ácido oleico causou um aumento pequeno da autofluorescência, $2 \pm 0,5\%$ em relação à linha base, verificando-se que o sinal recupera totalmente quando se volta à solução de ACSF. No entanto, seria necessário realizar mais experiências para se poder tirar uma conclusão mais concreta acerca deste estudo.

5.2 Estudos de variações de zinco

5.2.1 Sinais de zinco induzidos por TEA

Nestas experiências estudou-se o efeito de TEA, um composto que bloqueia canais de potássio dependentes de potencial, induzindo quimicamente a LTP, em sinais de zinco medidos com a forma permeante do indicador de zinco Newport Green.

Verifica-se também o efeito da tolbutamida, um bloqueador de canais de potássio dependentes de ATP (canais de K_{ATP}). A ativação destes canais por zinco origina uma hiperpolarização da membrana celular, esperando-se que o efeito seja contrariado pela tolbutamida.

A solução de TEA (25 mM) aplicada continha mais cálcio (10 mM) e mais KCl (5 mM) que o ACSF de modo a aumentar a atividade sináptica. Após a perfusão de ACSF durante 10 minutos, aplicaram-se sequencialmente as soluções de TEA e ACSF, tendo sido todas perfundidas durante períodos iguais, de 30 minutos. Nas experiências com tolbutamida, este composto foi adicionado à segunda solução de TEA que foi perfundida logo após a primeira.

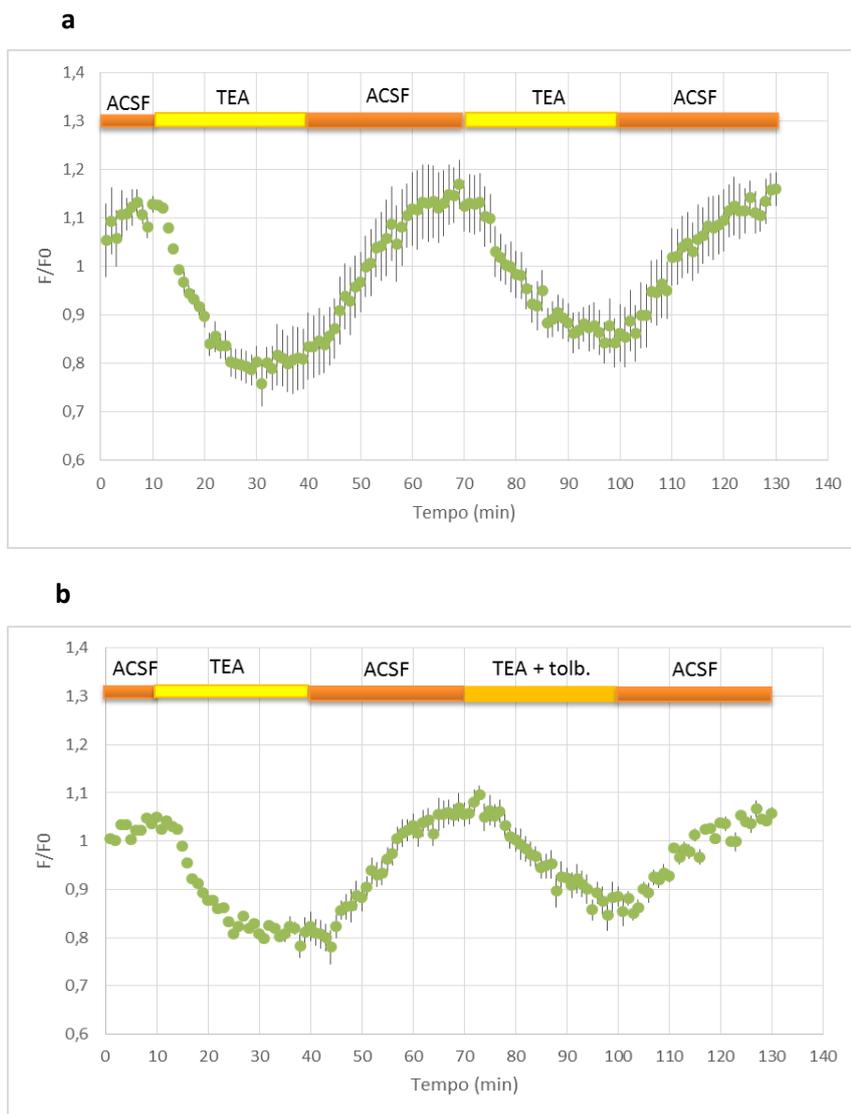


Figura 17 – Efeito nos sinais de zinco após a introdução de TEA. **a.** Perfusão de TEA durante 30 minutos cada intercalada com perfusão de ACSF durante 30 minutos, $n=2$. **b.** Perfusão de TEA durante 30 minutos seguida de ACSF durante 30 minutos e por fim mais 30 minutos de TEA + tolbutamida, $n=2$. Os pontos representam a média \pm s.e.m.

Analisando a Figura 17 verifica-se que o TEA provoca uma diminuição da intensidade do sinal de zinco, de $26 \pm 5\%$ medida no período 35-40 min. A segunda perfusão de TEA apresenta uma diminuição menos acentuada que a primeira, com uma amplitude de cerca de $21 \pm 6\%$ em relação à linha base.

Quando se junta tolbutamida, Figura 17.b, mais TEA, a diminuição da intensidade, em comparação com a segunda, é visivelmente menor, passando de um pico de $18 \pm 2\%$, abaixo da linha base, para $12 \pm 2\%$.

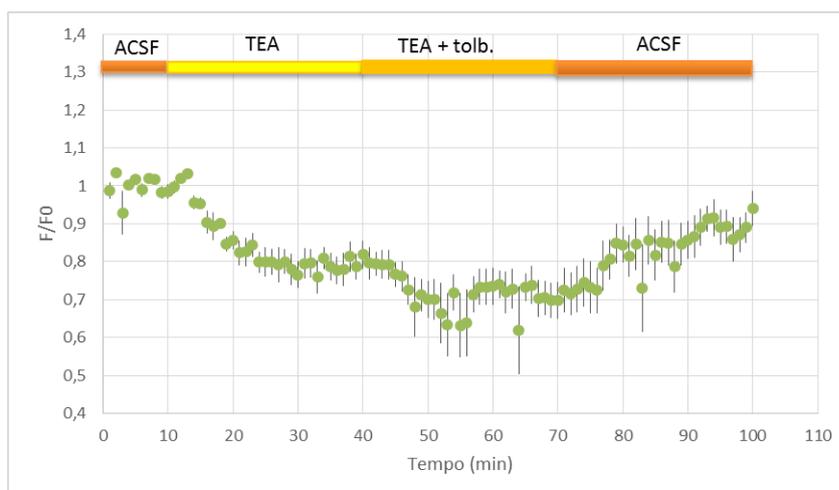


Figura 18 – Sinais de zinco na presença de TEA e de TEA + tolbutamida, (n=4). Os pontos representam a média \pm s.e.m.

No entanto, quando não é perfundida a solução de ACSF entre a solução de TEA e a de TEA mais tolbutamida observa-se pelo contrário, na Figura 18, um aumento da amplitude da depressão induzida por TEA, na presença de tolbutamida, de $20 \pm 3\%$ para $28 \pm 5\%$ em relação à linha base (n = 4). Este sinal recupera parcialmente quando se volta a perfundir ACSF.

5.2.2 Efeito do ácido oleico em sinais de zinco

As variações de zinco foram medidas igualmente usando o indicador fluorescente de zinco, Newport Green. O protocolo experimental destas experiências consistiu na aplicação do meio normal de perfusão, ACSF, durante 10 minutos, seguido das soluções de ácido oleico e de ACSF novamente, 30 minutos cada.

As concentrações testadas de ácido oleico foram de 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M e 100 μ M. A Figura 19 apresenta os resultados obtidos com os valores de fluorescência normalizados e corrigidos pela autofluorescência.

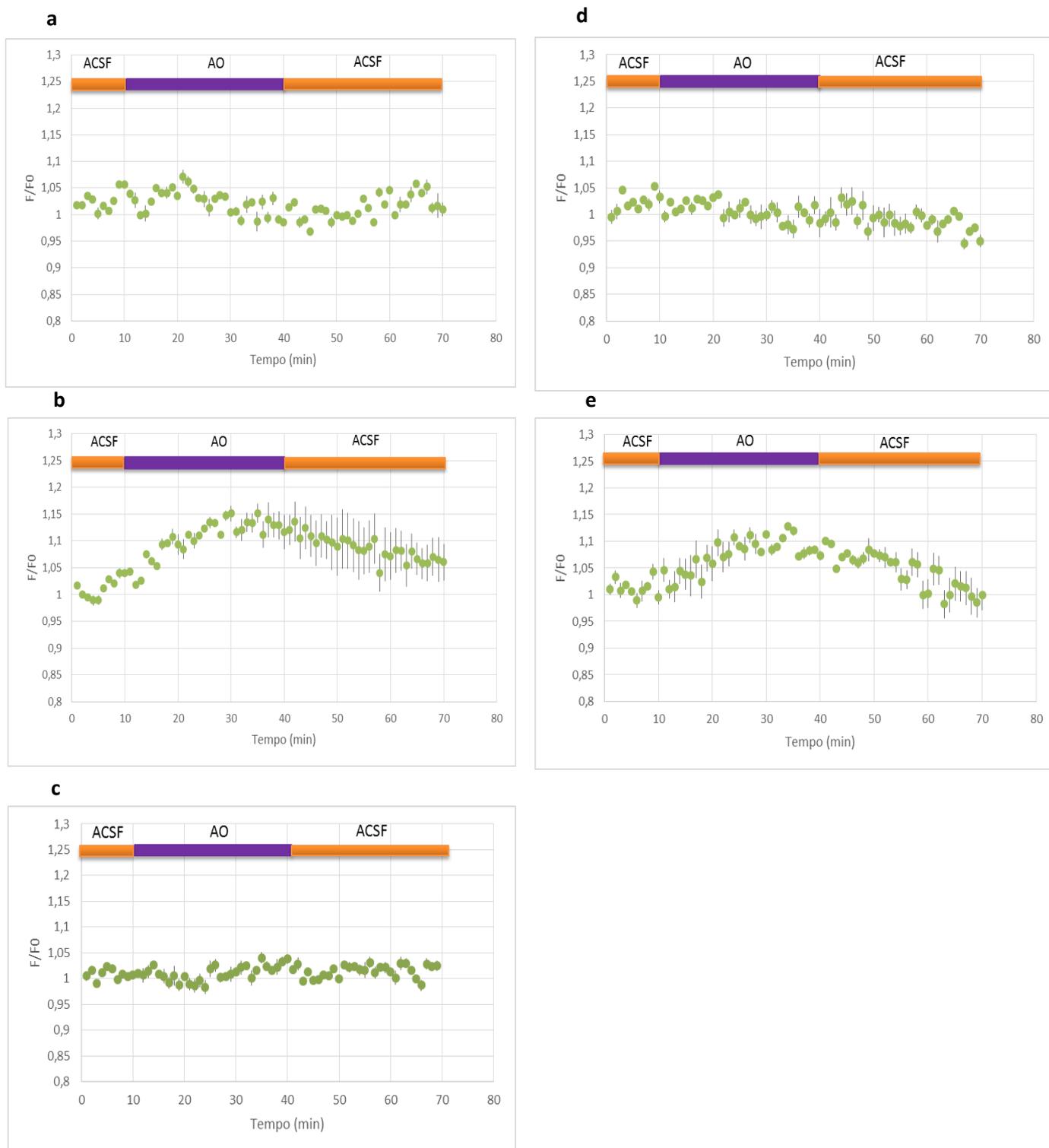


Figura 19 – Efeito de várias concentrações de ácido oleico em sinais de zinco. **a.** Sinais obtidos para uma concentração de 10 μM de ácido oleico, $n=2$. **b.** Sinais obtidos para uma concentração de 20 μM de ácido oleico, $n=3$. **c.** Sinais obtidos para uma concentração de 40 μM de ácido oleico, $n=3$. **d.** Sinais obtidos para uma concentração de 60 μM de ácido oleico, $n=2$. **e.** Sinais obtidos para uma concentração de 100 μM de ácido oleico, $n=2$. Os pontos representam a média \pm s.e.m.

Como se observa na Figura 19, a concentração de ácido oleico que induz maior variação nos sinais de zinco é de 20 μM . Naquela figura, os sinais de zinco que aumentam fazem-no a partir do momento em que é introduzido o ácido oleico (minuto 10), ficando estáveis no final da sua aplicação (durante o período 35-40 min). Quando é perfundida novamente a solução de ACSF a intensidade volta a baixar ficando com um valor constante superior, nalguns casos, ao da linha base. É de notar que para a concentração de 100 μM também se observa uma ligeira variação.

Para comparar as amplitudes máximas das variações induzidas pelas diferentes concentrações do ácido oleico, elaborou-se para cada concentração um gráfico de barras que está representado na Figura 20.

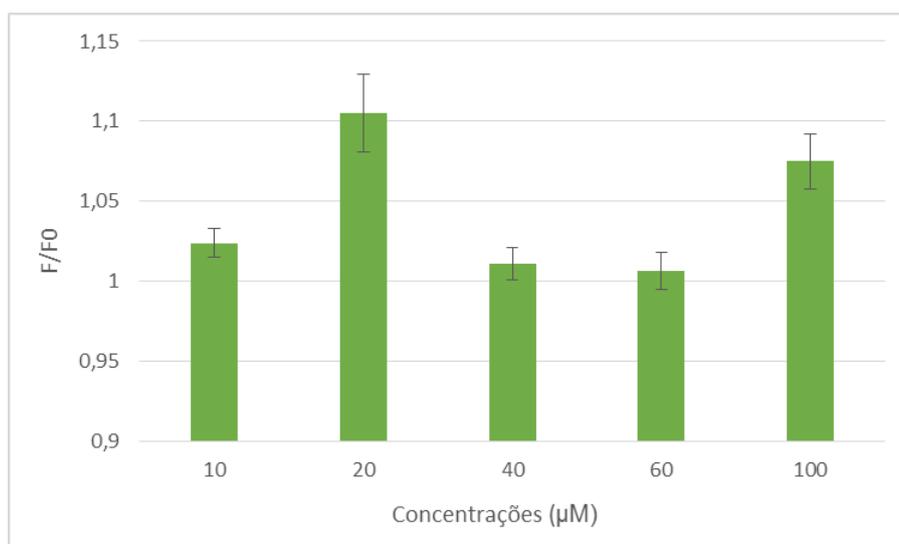


Figura 20 – Intensidade de fluorescência normalizada dos sinais de zinco para as várias concentrações do ácido oleico. As barras representam, para cada concentração, o valor máximo do sinal mais a barra de erro, durante a aplicação do ácido oleico.

Para investigar a origem sináptica dos sinais de zinco foi ainda aplicada uma solução de bloqueadores da transmissão sináptica após a perfusão de ácido oleico.

Esta solução continha NBQX, que é um antagonista dos recetores de glutamato do tipo AMPA/kainato e nifedipina que bloqueia VDCCs, do tipo L.

Nesta experiência, como mostra a Figura 21, perfundi-se inicialmente ACSF durante 10 minutos, seguido de 30 minutos da solução de ácido oleico e depois mais 30 minutos do meio contendo os bloqueadores, NBQX (10 μ M) e nifeipina (10 μ M). Por fim perfundi-se de novo ACSF durante 30 minutos.

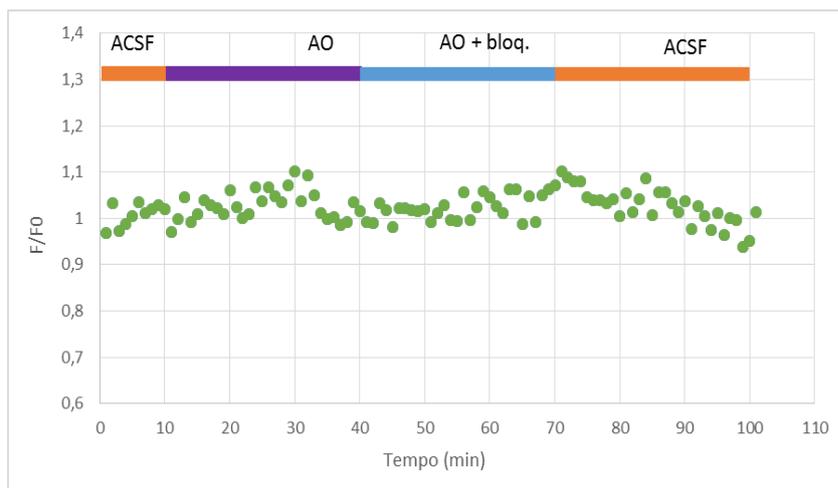


Figura 21 – Efeito de bloqueadores da transmissão sináptica no sinal de zinco induzido pelo ácido oleico (40 μ M). Os bloqueadores utilizados foram NBQX (10 μ M) e nifedipina (10 μ M).

Observando os resultados, nota-se que existe uma pequena subida do sinal normalizado de zinco na presença do ácido oleico, diminuindo o sinal para o nível da linha base, no final da aplicação do ácido. Durante a perfusão dos bloqueadores, o sinal sobe ligeiramente recuperando depois em ACSF. Como as variações são muito pequenas e a diminuição do sinal teve início antes da aplicação dos bloqueadores, esta experiência não permite tirar conclusões sobre a natureza do sinal.

6. Discussão

A introdução de uma solução de KCl (20 m) no meio biológico extracelular promove uma despolarização da membrana. A despolarização consiste num aumento da diferença de potencial, criada pela variação do gradiente de concentrações dos iões K^+ e Cl^- , entre os meios intra e extracelular. Os iões K^+ difundem-se através da membrana para o meio intracelular. Uma maior concentração de K^+ provoca a abertura de canais de cálcio dependentes do potencial, favorecendo o fluxo de cálcio para dentro das células. Como tinha sido referido na subsecção 2.4, a quantidade de cálcio que entra pode estar relacionada com a intensidade de autofluorescência. Isto porque o aumento do cálcio intracelular pode desencadear também um aumento do FAD (da família das flavoproteínas) e do NAD, bem como a oxidação do $FADH_2$ e do NADH. Estes acontecimentos estão associados à fluorescência intrínseca que tem origem na atividade mitocondrial (Duchen 1992). Como se utilizou um filtro de excitação de 480 nm e se recolheu a luz de emissão acima dos 500 nm, a autofluorescência detetada é proveniente do FAD.

Os resultados obtidos mostram, que a aplicação de uma solução com +20 mM KCl e -20 mM NaCl, ou seja, uma solução com osmolaridade normal, origina um elevado aumento da intensidade de autofluorescência. Esta subida deve ser devida ao aumento da concentração dos compostos fluorescentes referidos anteriormente, provenientes da atividade mitocondrial despoletada pelo aumento da concentração intracelular de cálcio. Quando se volta a perfundir ACSF durante 30 minutos, a atividade sináptica não recupera totalmente, uma vez que os sinais não regressam à linha base.

Quando se introduz uma solução hiperosmótica (+20 mM KCl) a variação de fluorescência é bastante menor. Verifica-se que as células podem apresentar diferentes tolerâncias à desidratação, podendo algumas permanecer funcionais em meios hiperosmóticos. Neste caso a tolerância das células ao meio hiperosmótico aplicado pode ter sido ultrapassada, levando a uma diminuição do volume celular e da atividade biológica e à consequente redução da autofluorescência (Luh, et al. 1994).

Para conhecer o papel do zinco libertado nos sinais de autofluorescência medidos, adicionou-se o quelante de zinco, Ca-EDTA, à solução de KCl hiperosmótica. O quelante, que é impermeante tem como principal função ligar-se ao zinco, existente na fenda sináptica, evitando que ele entre nas células pós-sinápticas. Os resultados obtidos sugerem que os sinais

de autofluorescência não são afetados pela quantidade de zinco na fenda pois eles são semelhantes aos detetados na ausência de Ca-EDTA.

O TEA também provoca a despolarização das membranas e induz quimicamente a LTP. Esta despolarização origina igualmente a entrada de cálcio na zona pré-sináptica, e a consequente fusão das vesículas na membrana. Visto que as vesículas contêm zinco, a sua fusão e abertura para o meio extracelular resulta na libertação daquele ião para a fenda sináptica. O zinco libertado ativa os canais K_{ATP} existentes em concentrações elevadas na zona pré-sináptica (Bancila, Nikonenko e Dunant 2004). Este facto permite a entrada de potássio na célula pré-sináptica, originando a hiperpolarização da membrana. Isto faz com que a atividade das células seja inibida, observando-se por isso uma diminuição da autofluorescência. Considera-se que estes sinais são provenientes principalmente da atividade mitocondrial na zona pré-sináptica, que ao ser inibida resulta numa produção de FAD, o composto endógeno que se pensa estar na origem dos sinais de autofluorescência detetados.

A diminuição verificada nos sinais de autofluorescência induzidos por TEA deve-se a uma hiperpolarização da membrana. Apesar do TEA causar inicialmente uma despolarização da membrana, como acontece com a aplicação de KCl, a hiperpolarização originada pela consequente abertura dos canais K_{ATP} parece sobrepor-se à despolarização. No caso da aplicação do KCl, que também pode afetar a potencial das membranas pós-sinápticas, a despolarização parece ser preponderante.

Para conhecer a influência do ácido oleico nos sinais de autofluorescência, testaram-se duas concentrações distintas deste composto, 20 μM e 40 μM . Os resultados obtidos mostram que os sinais se mantêm na presença da solução com 20 μM e que diminuem ligeiramente, em relação à linha base após a retirada do ácido. Uma possível interpretação destes resultados é que a ação do ácido oleico resulta num aumento da atividade mitocondrial, sendo necessárias mais experiências para testar esta hipótese.

Relativamente aos sinais de zinco, foi primeiro estudado o efeito de TEA, composto que permite induzir a LTP.

A aplicação de TEA leva a que o zinco libertado ative os canais de potássio dependentes de ATP e à hiperpolarização das células pré-sinápticas onde estes canais existem em abundância. Como consequência passa a libertar-se menos glutamato e zinco, na presença de TEA, originando uma diminuição da quantidade de zinco que entra na região pós-sináptica. O indicador usado, a forma permeante de Newport Green que só deteta sinais pós-sinápticos,

deve assim formar menos complexos com zinco o que se traduz numa diminuição da fluorescência.

Para investigar o envolvimento dos canais K_{ATP} na depressão observada em TEA, perfundi-se uma solução contendo TEA mais tobultamida, que é um inibidor dos canais K_{ATP} .

No primeiro caso, em que se aplicou a solução de TEA mais tobultamida a seguir a uma de ACSF, de modo a permitir a recuperação da fluorescência, verifica-se uma diminuição da amplitude da depressão dos sinais de zinco, em relação à observada na presença de TEA apenas. Este facto sugere que o Zn^{2+} ativa os canais K_{ATP} , pois na presença de tolbutamida que os bloqueia, a depressão, e portanto a hiperpolarização é menor. Neste caso liberta-se mais zinco, entrando menos na zona pós-sináptica.

No segundo caso, em que não se permitiu a recuperação da fatia, ou seja, perfundi-se a solução de TEA mais tobultamida logo a seguir à solução de TEA, a depressão aumentou em vez de diminuir, contrariamente ao que se esperava. Nestas experiências, as fatias também estiveram mais tempo seguido expostas a TEA (1 h), o que deve estar relacionado com a segunda descida do sinal. Como a fatia não esteve em ACSF entre a aplicação das duas soluções, não recuperou não se tendo observado a potenciação do sinal.

Para testar as variações de zinco na presença de ácido oleico, foram perfundidas cinco concentrações distintas de ácido oleico, 10 μM , 20 μM , 40 μM , 60 μM e 100 μM .

Verificou-se que as concentrações que produzem uma maior variação são as de 20 μM e 100 μM . Nestes dois casos o ácido oleico poderá originar a despolarização da membrana pré-sináptica provocando a abertura de canais de cálcio dependentes do potencial. A entrada de Ca^{2+} provoca a fusão de vesículas com a membrana pré-sináptica permitindo a libertação de Zn^{2+} na fenda sináptica. Se a libertação for intensa o zinco entra na região pós-sináptica sendo aí detetado pelo indicador Newport Green.

No entanto, a fluorescência não varia linearmente com o aumento da concentração do ácido, podendo, portanto, haver outros mecanismos celulares associados a estas variações.

Para determinar a origem, pré ou pós-sináptica dos sinais de zinco usou-se uma solução de bloqueadores, contendo o antagonista dos recetores de AMPA/kainato, NBQX e o bloqueador de VDCCs do tipo L, nifedipina. O resultado não é claro e, uma vez que é de uma experiência apenas, não é conclusivo.

A menor fluorescência registada na presença dos bloqueadores sugere que o efeito do ácido oleico tem uma natureza pós-sináptica. Impedindo a transmissão sináptica por meio do bloqueio de recetores/canais da membrana pós-sináptica, o zinco deixa de poder entrar na região pós-sináptica, o que resultaria numa menor intensidade dos sinais de zinco registados naquela zona.

7. Conclusões e perspectivas futuras

Os sinais de autofluorescência medidos permitiram entender, tendo em conta que devem ter origem no FAD mitocondrial de que forma, o KCl e o TEA, interagem na atividade sináptica. O KCl cria uma despolarização das membranas causando uma abertura de canais de cálcio dependentes do potencial, favorecendo o fluxo de cálcio para o interior das células e a fusão das vesículas sinápticas, exigindo este processo energia que é fornecida pelas mitocôndrias. O TEA sujeita as membranas celulares a uma despolarização, seguida de hiperpolarização. A despolarização, que ocorre inicialmente, origina a entrada de cálcio que faz com que as vesículas pré-sinápticas se fundam na membrana e libertem Zn^{2+} , que ativa os canais K_{ATP} permitindo a entrada de íons K^+ , que causa a hiperpolarização.

Quanto ao estudo da autofluorescência na presença de ácido oleico, os estudos efetuados sugerem que a sua ação leva à despolarização da membrana favorecendo a entrada de cálcio, que promove a atividade mitocondrial.

Os estudos efetuados sobre as variações de zinco permitiram concluir que induzindo quimicamente a LTP, com TEA, a despolarização inicial origina a libertação de zinco. Este íon ativa os canais K_{ATP} levando à hiperpolarização da membrana. A aplicação de tobultamida confirmou nas experiências em que se aplicou ACSF entre as duas soluções com TEA, o papel inibitório do zinco nas sinapses estudadas.

Quanto ao ácido oleico verificou-se que este influencia a atividade sináptica, não variando linearmente os sinais de zinco com a concentração daquele ácido. Os resultados sugerem que, para determinadas concentrações, o ácido oleico induz despolarização da membrana promovendo a libertação de zinco.

Como trabalhos futuros deveriam ser efetuadas mais experiências com bloqueadores de mecanismos pós-sinápticos para determinar a origem das variações de zinco induzidas pelo ácido oleico. Seria também importante realizar mais estudos sobre variações de autofluorescência induzidas por aquele ácido. O objetivo seria comparar sinais de autofluorescência detetados na presença de mais concentrações do ácido com os correspondentes sinais de zinco, para ver se há correspondência. A semelhança entre os dois tipos de sinais observados em experiências com TEA sugere que a autofluorescência constitui uma forma muito importante, por ser não invasiva e não requerer a utilização de substâncias

exógenas, para investigar a atividade sináptica. Permite além disso avaliar mais rapidamente, porque não é necessário incubar as fatias, e com menos custos, a toxicidade de poluentes que podem interferir com a transmissão e a plasticidade sinápticas.

Bibliografia

- A. Córdoba-Montoya, Daniel , Jacobo Albert, e Sara López-Martín. “All together now: long term potentiation in the human cortex.” 9 de Março de 2010: 51 (6): 367-374.
- A. Menendez, J. , L. Vellon, R. Colomer, e R. Lupu. “Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erb B-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptine) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification.” 10 de Janeiro de 2005: 359-371.
- A. Menendez, Javier , Adriana Papadimitropoulou, Luciano Vellona, e Ruth Lupu. “A genomic explanation connecting “Mediterranean diet”, olive oil and cancer: Oleic acid, the main monounsaturated Fatty acid of olive oil, induces formation of inhibitory “PEA3 transcription factor-PEA3 DNA binding site” complexes at the Her-2/neu (er.” *European Journal of Cancer*, 2006: (4 2) 2425–2432.
- A. Trautwein, Elke , e Isabelle Demonty. “Phytosterols: natural compounds with established and emerging health benefits.” Setembro de 2007: 259-266.
- Andersen, Per, Richard Morris, David Amaral, Tim Bliss, e Jonh O'Keefe. *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press, 2007.
- Azabou, Samia, Tahar Mechichi, Alcina Pereira, Madalena Alves, e Sami Sayadi. “A comparative study of the biodegradability of oleic acid by sludge from a reactor fed with olive mill wastewater and sludge from a reactor fed with oleic acid .” *Proceedings of the 5th Tunisia-Japan Symposium on Culture, Science and Techonology*, 24 de Maio de 2004: 142-144.
- B. Thompson, R., et al. “Fluorescent zinc indicators for neurobiology.” *Journal of Neuroscience Methods*, 9 de Maio de 2002: 63-75.
- Bancila, Victor , Irina Nikonenko, e Yves Dunant. “Zinc inhibits glutamate release via activation of pre-synaptic KATP channels and reduces ischaemic damage in rat hippocampus.” *Journal of Neurochemistry* , 2004: 90, 1243–1250.
- Beccari, M., F. Bonemazzi, M. Majone, e C. Riccardi. “Interaction Between Acidogenesis and Methanogenesis in the Anaerobic Treatment of Olive Oil Mill Effluents.” Março de 1995: 183-189.

- Calderone, Agata , et al. “Late Calcium EDTA Rescues Hippocampal CA1 Neurons from Global Ischemia-Induced Death .” *Neurobiology of Disease*, 3 de Novembro de 2004: 24(44): 9903–9913.
- Chen, Chung-Yen, Karen Lapsley , e Jeffrey Blumbe. “A nutrition and health perspective on almonds.” 28 de Setembro de 2006: 86:2245–2250.
- C. Reinert, Kenneth, Wangcai Gao, Gang Chen, e Timothy J. Ebner. “Flavoprotein Autofluorescence Imaging in the Cerebellar Cortex In Vivo.” *Journal of Neuroscience Research* , 22 de Maio de 2007: 85: 3221–3232 .
- Chen, Chung-Yen, Karen Lapsley, e Jeffrey Blumberg. “A nutrition and health perspective on almonds.” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28 de Setembro de 2006: 86: 2245–2250.
- E. Pereda, Alberto . “Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses.” 12 de Março de 2014: 250-263.
- Elkacmi, Reda , Noureddine Kamil, Mounir Bennaja, e Said Kitane. “Extraction of Oleic Acid from Moroccan Olive Mill Wastewater.” 7 de Dezembro de 2015: 1-9.
- E. Dineley , Kirk, Latha M. Malaiyandi, e Ian J. Reynolds. “A Reevaluation of Neuronal Zinc Measurements: Artifacts Associated with High Intracellular Dye Concentration.” 21 de Maio de 2002: 618-627.
- F. Cooke , S. , e T. V. P. Bliss. “Plasticity in the human central nervous system.” 3 de Maio de 2006: 129: 1659–1673.
- Gokce, Noyan . “L-Arginine and Hypertension.” *The Journal of Nutrition*, 2004: 2807S-2811S.
- H. Hennig, Matthias . *Modelling Synaptic Transmission*. ANC, Informatics, University of Edinburgh, s.d.
- H. Weiss, John , Stefano L. Sensi , e Jae Y. Koh. “Zn²⁺: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease.” *Trends in Pharmacological Sciences*, Novembro de 2000: 395-401.
- Haug, Anna, Arne T. Høstmark, e Odd M. Harstad. “Bovine milk in human nutrition – a review.” 25 de Setembro de 2007: 1-16.

- Huang, Yan-You , e Robert C. Malenka. “Examination of TEA-induced Synaptic Enhancement in Area CA1 of the Hippocampus: The Role of Voltage-dependent Ca⁺ Channels in the Induction of LTP.” *The Journal of Neuroscience*, Fevereiro de 1993: 566-576.
- I. Bashir, Zafar, et al. “Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors.” 27 de Maio de 1993: 347-363.
- Isabel Covas, María. “Olive oil and the cardiovascular system.” *Pharmacological Research* , 19 de Janeiro de 2007: 175–186.
- Izumi, Yukitoshi , Yves P. Auberson, e Charles F. Zorumski. “Zinc Modulates Bidirectional Hippocampal Plasticity by Effects on NMDA Receptors.” *The Journal of Neuroscience*, 5 de Julho de 2006: 26(27): 7181–7188.
- J. A. Jenkins , David, et al. “Almonds Decrease Postprandial Glycemia, Insulinemia, and Oxidative Damage in Healthy Individuals.” 22 de Setembro de 2006: 2987-2992.
- J. Linden , David , e Aryeh Routtenberg. “The role of protein kinase C in long-term potentiation: a testable model .” *Brain Research Reviews*, 27 de Junho de 1989: 14: 279-296.
- J. Stork , Christian , e Yang V. Li. “Intracellular Zinc Elevation Measured with a “Calcium-Specific” Indicator during Ischemia and Reperfusion in Rat Hippocampus: A Question on Calcium Overload.” *The Journal of Neuroscience*, 11 de Outubro de 2006: 26 (41):10430 –10437.
- J.A. Jenkins, David , et al. “Dose Response of Almonds on Coronary Heart Disease Risk Factors: Blood Lipids, Oxidized Low-Density Lipoproteins, Lipoprotein(a), Homocysteine, and Pulmonary Nitric Oxide. A Randomized, Controlled, Crossover Trial.” 10 de Setembro de 2002: 106:1327-1332.
- K. Ketterman , Joshua, e Yang V. Li. “Presynaptic Evidence for Zinc Release at the Mossy Fiber Synapse of Rat Hippocampus.” 2 de Julho de 2007: 86:422–434.
- Kiefer, Dale . “Benefits for Body Weight, Heart Health, and More.” Maio de 2007: 83-85.
- Kim, Jin Hee, et al. “Zinc Chelation Reduces Hippocampal Neurogenesis after Pilocarpine-Induced Seizure.” 31 de Outubro de 2012: 1-10.

- K. Vassiliou, Evros, Andres Gonzalez, Carlos Garcia, James H. Tadros, Goutam Chakraborty, e Jeffrey H. Toney. "Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF- both in vitro and in vivo systems." 26 de Junho de 2009: 1-10.
- Kohen, Ron, e Abraham Nyska. "Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification." *Toxicology Pathology*, 2002: 620-650.
- Kosterin, P., G. H. Kim, M. Muschol, A.L. Obaid, e B.M. Salzberg. "Changes in FAD and NADH Fluorescence in Neurosecretory Terminals Are Triggered by Calcium Entry and by ADP Production." *Membrane Biology*, 2005: 113-124.
- L. Auten, Richard, e Jonathan M. Davis. "Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details." *Pediatric Research*, 6 de Abril de 2009: Vol. 66, 121-127.
- L. Harwooda, John, e Parveen Yaqoobb. "Nutritional and health aspects of olive oil." 2002: 685–697.
- L. Sensi, Stefano, et al. "Measurement of Intracellular Free Zinc in Living Cortical Neurons: Routes of Entry." *The Journal of Neuroscience*, 15 de Dezembro de 1997: 17(24): 9554–9564.
- Lesage-Meessena, L. , et al. "Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems." *Food Chemistry* , 16 de Maio de 2001: 501–507.
- Li, Yang, Christopher J. Hough, Sang Won Suh, Jonh M. Sarvey, e Christopher J. Frederickson. "Rapid Translocation of Zn²⁺ From Presynaptic Terminals Into Postsynaptic Hippocampal Neurons After Physiological Stimulation." 25 de Maio de 2011: 2597-2604.
- Lim, Ji-Hong , et al. "Oleic Acid Stimulates Complete Oxidation of Fatty Acids through Protein Kinase A-dependent Activation of SIRT1-PGC1 Complex*." 17 de Janeiro de 2013: 10: 7117-7127.
- Llor , X., et al. "The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes." *Clinical Nutrition* , 2003: 22(1): 71–79.

- Luh, E. H. , S. R. Shackford, M. A. Shatos, e J. A. Pietropaoli. “The Effects of Hyperosmolarity on the Viability and Function of Endothelial Cells.” 6 de Julho de 1994: 60, 122–128.
- Lavoie, Nathalie, et al. “Extracellular chelation of zinc does not affect hippocampal excitability and seizure-induced cell death in rats.” 2 de Novembro de 2006: 275–289.
- Qian, Jing, e Jeffrey L. Noebels. “Visualization of transmitter release with zinc fluorescence detection at the mouse hippocampal mossy fibre synapse.” 26 de Maio de 2005: 747–758.
- T. Hancock, J., R. Desikan, e S. J. Neil. “Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways.” 2001: 342-350.
- M. T. Canzoniero, L. , S. L. Sensi, e D. W. Choi. “Measurement of Intracellular Free Zinc in Living Neurons.” 21 de Agosto de 1997: 4: 275–279.
- Marin, Phillippe, Maurice Israël, Jacques Glowinski, e Joël Prémont. “Routes of zinc entry in mouse cortical neurons: role in zinc-induced neurotoxicity.” 2 de Setembro de 1999: 12: 8-18.
- Matias, Carlos. *Estudo de fluorescência de variações neurais de cálcio e de zinco associadas com a potenciação de longa duração no hipocampo*. Tese de Doutorado, Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2001.
- Monici, Monica. “Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications.” *Biotechnology annual review*, Fevereiro de 2005: 227-256.
- Murakami, Kentaro , e Aryeh Routtenberg. “Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca²⁺.” Novembro de 1985: 192: 189-193.
- P. Cuajungco , Math, e Gordon J. Lees. “Diverse effects of metal chelating agents on the neuronal cytotoxicity of zinc in the hippocampus.” *Brain Research*, 28 de Abril de 1998: 97–107.
- Packer , L., L. Prilipko , e Y. Christen. *Free Radicals Radicals in Brain - Aging, Neurological and Mental Disorders*. Berlin : Springer-Verlag, 1992.
- Purves, Dale, et al. *Neuroscience*. Sunderland, Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates, Inc., 2004.

- Quinta-Ferreira, M. E., e C. M. Matias. “Tetanically released zinc inhibits hippocampal mossy fiber calcium, zinc and synaptic responses.” *Brain Research*, 1 de Abril de 2005: 1-9.
- Quinta-Ferreira, M. E., J. C. Dionísio, C. M. Matias, e M. Arif. “Measurement of presynaptic zinc changes in hippocampal mossy fibers.” 28 de Julho de 2004: 1-10.
- R. Duchen, Michael . “Ca²⁺-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons.” 1992: 283, 41-50.
- R. Morris, Deborah, e Cathy W. Levenson. “Ion Channels and Zinc: Mechanisms of Neurotoxicity and Neurodegeneration.” *Journal of Toxicology*, 9 de Janeiro de 2012: 1-6.
- Rezaul Karim , Mohammad , e David H. Petering. “Newport Green, a fluorescent sensor of weakly bound cellular Zn²⁺: competition with proteome for Zn²⁺.” 25 de Novembro de 2015: 201-210.
- Ros, Emilio. “Health Benefits of Nut Consumption.” *Nutrients*, 24 de Junho de 2010: 2, 652-682.
- R. Lakowicz, Joseph. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York, USA: Springer, 2006.
- Redenti , Stephen, Harris Ripps , e Richard L. Chappell. “Zinc release at the synaptic terminals of rod photoreceptors.” *Experimental Eye Research*, 3 de Agosto de 2007: 580-584.
- S.A. de Silva, Punyanganie, Robert Lubend, Subodha S. Shresthad, Kay T. Khawc, e Andrew R. Harta. “Dietary arachidonic and oleic acid intake in ulcerative colitis etiology: a prospective cohort study using 7-day food diaries.” 10 de Agosto de 2013: 11-18.
- Serranoa, Faridis , e Eric Klann. “Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus.” *Ageing Research Reviews* , 6 de Maio de 2004: 431-443.
- Shuttleworth, C. William . “Use of NAD(P)H and flavoprotein autofluorescence transients to probe neuron and astrocyte responses to synaptic activation.” *Neurochemistry International*, 29 de Dezembro de 2010: 56: 379–386.
- Song, Dong , Xiaping Xie, Zhuo Wang, e Theodore W. Berger. “Differential Effect of TEA on Long-Term Synaptic Modification in Hippocampal CA1 and Dentate Gyrus in vitro.” *Neurobiology of Learning and Memory*, 2001: 76, 375–387.

- Stewart, M. G., et al. “Chemically induced long-term potentiation increases the number of perforated and complex postsynaptic densities but does not alter dendritic spine volume in CA1 of adult mouse hippocampal slices.” *European Journal of Neuroscience*, 24 de Abril de 2005: 3368–3378.
- Suzuki, Etsuko, e Takashi Okada. “Regional differences in GABAergic modulation for TEA-induced synaptic plasticity in rat hippocampal CA1, CA3 and dentate gyrus.” *Neuroscience Research*, 28 de Junho de 2007: 183–190.
- Suzuki, Etsuko, e Takashi Okada. “TEA-induced long-term potentiation at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses: Characteristics of its induction and expression.” *Brain Research*, 30 de Setembro de 2008: 21–27.
- Terés, S., G. Barceló Coblijn., M. Benet, e R. Álvarez. “Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil.” 1 de Agosto de 2008: 13811-13816.
- W. Choi, Dennis , e Jae Y. Koh. “Zinc and Brain Injury.” *Annu. Rev. Neurosci.*, 1998: 21:347–375.
- Xie, Xinmin , e Trevor G. Smart. “Modulation of long-term potentiation in rat hippocampal pyramidal neurons by zinc.” 20 de Janeiro de 1994: 427:481-486.
- Xiao, Yong-Fu, e Xiangyang Li. “Polyunsaturated fatty acids modify mouse hippocampal neuronal excitability during excitotoxic or convulsant stimulation.” 17 de Agosto de 1999: 112-121.

Netgrafia

Wikipedia. s.d. <https://en.wikipedia.org/wiki/Almond#Production> (acedido em Fevereiro de 2016).

Wikipedia. s.d. https://en.wikipedia.org/wiki/Olive_oil (acedido em Maio de 2016). *nutrition-and-you*. s.d. <http://www.nutrition-and-you.com/olive-oil.html> (acedido em Maio de 2016).

Provital Group. *centerchem.com*. s.d. <http://www.centerchem.com/Products/DownloadFile.aspx?FileID=6849> (acedido em Fevereiro de 2016).

Food Science Wiki. s.d. <http://foodscience.wikispaces.com/Nuts> (acedido em Fevereiro de 2016).

California Almonds. *AlmondBoard.com*. 2013. http://www.almonds.com/sites/default/files/content/attachments/aq0100_almond_nutrient_comparison_chart_-_final_-_3_27.pdf (acedido em Fevereiro de 2016).

Zamora, Antonio. 2016. <http://www.scientificpsychic.com/fitness/fattyacids1.html> (acedido em Maio de 2016).

ANEXOS

Anexo A

Tabela 7 - Composição da amêndoa (*Drugs s.d.*) (*Food Science Wiki s.d.*) (*Provital Group s.d.*) (*California Almonds 2013*) (*Wikipedia s.d.*) (*Chen, Lapsley e Blumberg 2006*).

	Composição	Unidades
Água	4,7	g
Proteínas	19 - 21,22	g
<i>Triptofano</i>	0,214	g
<i>Treonina</i>	0,598	g
<i>Isoleucina</i>	0,702	g
<i>Leucina</i>	1,488	g
<i>Lisina</i>	0,58	g
<i>Metionina</i>	0,151	g
<i>Cistina</i>	0,189	g
<i>Phenilalanina</i>	1,12	g
<i>Tirosina</i>	0,452	g
<i>Valina</i>	0,817	g
<i>Arginina</i>	2,446	g
<i>Histidina</i>	0,557	g
<i>Alanina</i>	1,027	g
<i>Ácido Aspártico</i>	2,911	g
<i>Ácido Glutâmico</i>	6,81	g
<i>Glicina</i>	1,469	g
<i>Prolina</i>	1,032	g
<i>Serina</i>	0,948	g

Carboidratos	4,8 - 21,69	g
Fibras	2,6 - 15,0	g
Açúcares	3,89	g
Cinzas	3	g
Ácidos Gordos	-	g
<i>Saturados</i>	3,95	g
<i>Ácido Palmitico</i> <i>(C16:0)</i>	3,04	g
<i>Ácido Esteárico</i> <i>(C18:0)</i>	0,66	g
<i>Monosaturado</i>	30,89	g
<i>Ácido Oleico (C18:1)</i>	30,61	g
<i>Ácido Palmitoleico</i> <i>(C16:1)</i>	0,24	g
<i>Polinsaturado</i>	12,07	g
<i>Ácido Linoleico</i> <i>(C18:2)</i>	12,06	g
<i>Ácido Linolenico</i> <i>(C18:3)</i>	0,01	g
Fitoesteróis	187	mg
<i>Beta-sitosterol</i>	149,6	mg
<i>Estigmasterol</i>	4,114	mg
<i>Campesterol</i>	5,423	mg
<i>Avenasterol</i>	20,57	mg
Minerais		
<i>Cálcio</i>	234	mg
<i>Fósforo</i>	484	mg

<i>Ferro</i>	4,7	mg
<i>Sódio</i>	2	mg
<i>Potássio</i>	773	mg
<i>Magnésio</i>	268	mg
<i>Zinco</i>	3,1	mg
<i>Cobre</i>	1	mg
<i>Manganésio</i>	2,3	mg
Vitaminas	-	
<i>Beta-caratona</i>	0,1	µg
<i>Fenóis</i>	0,418	g
<i>Flavanóides</i>	23,9	mg
<i>Luteína</i>	0,1	µg
<i>Tiamina</i>	0,24	mg
<i>Riboflavina</i>	0,92	mg
<i>Niacina</i>	3,9	mg
<i>Vitamina E (Alfa-tocofenol)</i>	26,18	mg
<i>Vitamina B5 (Ácido Pantoténico)</i>	0,49	mg
<i>Vitamin B6</i>	143	µg
<i>Folato (B9)</i>	5	µg
<i>Colina</i>	5,21	mg
Energia	576-598	Kcal

Tabela 8 - Composição do azeite (*nutrition-and-you s.d.*) (Zamora 2016) (Wikipedia s.d.).

	Composição	Unidades
Gorduras	100	g
Saturadas	16	g
<i>Ácido palmitico</i>	13	g
<i>Ácido esteriárico</i>	3	g
Monoinsaturadas	73	g
<i>Ácido oleico</i>	71	g
<i>Outros</i>	2	g
Polinsaturadas	11	g
<i>Ácido linoleico alfa</i>	1	g
<i>Ácido linoleico</i>	10	g
Vitaminas		
<i>Vitamina E</i>	14,39	mg
<i>Vitamina K</i>	60,2	µg
Minerais		
<i>Sódio</i>	2	mg
<i>Potássio</i>	1	mg
<i>Cálcio</i>	1	mg
<i>Ferro</i>	0,56	mg
<i>Zinco</i>	0,01	µg
Fitoesteróis	221	mg
Energia	884	Kcal

