

WAGNER MIRANDA BARBOSA

**EFEITO DA INGESTÃO DE CAFÉ SOBRE A
LIBERAÇÃO DE
GLUTAMATO SINAPTOSSOMAL, ESTIMULADA
POR TOXINA ESCORPIÔNICA,
EM RATOS**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2007

WAGNER MIRANDA BARBOSA

**EFEITO DA INGESTÃO DE CAFÉ SOBRE A
LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO
SINAPTOSSOMAL, ESTIMULADA POR TOXINA
ESCORPIÔNICA, EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG**

2007

Dedico esta dissertação à minha família, ao meu amor Flávia,
aos amigos, aos animais, ao Rock,
à cidade de Ouro Preto, à Nutrição, a
República Vira Saia e ao Ensino Público.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora. Aos meus pais, exemplos de seres humanos, PAI e MÃE, amo vocês. Aos meus avós, aos oito irmãos, tios (as) e primos (as) pelo apoio e incentivo. A Flávia, meu amor, pela presença, companhia e divisão dos fardos.

Ao Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos, pelo caráter e filosofia de vida, exemplo de pesquisador, pelos ensinamentos, orientação e acima de tudo pelo apoio, pelo cafezinho e amizade. A esposa do meu orientador, Maria, pelo carinho.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Experimental, Renata Viana Abreu, Maria das Graças Torquato, Nívea Maria Pacheco, Vinícius Paganini, Marclenia Eduardo Ramos, Eliane Silva, Gustavo Rezende, Silmara Araújo, Renata Lacerda, Ricardo Dornas e Antônio Massensini (Antony Hopinks) pela colaboração durante a realização deste trabalho e convívio sempre agradável. A Vanessa pela ajuda prestada.

Aos amigos do NNC – Núcleo de Neurociências, pela amizade.

Aos amigos LORDS – pelos momentos de lazer e iluminismo.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pelo conhecimento transmitido.

Ao Colégio Tiradentes da PMMG - Manhuaçu, UFOP e a Escola de Nutrição, UFMG. A todos os professores, em especial ao Prof. Dr. Marcelo Eustáquio da Silva, grande incentivador e compartilhador da ciência. Enfim ao ensino público e gratuito.

Às secretárias Úrsula Regiane Martins e Marilene Beatriz de Souza por estarem sempre disponíveis.

À veterinária Maria Adelaide Fernandes responsável pelo biotério da Faculdade de Farmácia e ao José Batista Viturino, pela disponibilidade, alegria transmitida e auxílio na manutenção dos animais utilizados.

Aos órgãos institucionais financiadores: FAPEMIG, CAPES, CNPq e PRPQ-UFMG.

Aos animais utilizados em prol do desenvolvimento da ciência.

A todos que, de diferentes maneiras, acreditaram, incentivaram e auxiliaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Café um breve histórico	14
2.1.1 Café como alimento funcional.....	16
2.1.2 Café e sistema nervoso central.....	18
2.2 Sinapses e o sistema glutamatérgico.....	19
2.3 Receptores de glutamato.....	24
2.4 Sinaptossomos	25
2.5 Desnutrição	26
2.5.1 Desnutrição, sistema nervoso central e sistema nervoso glutamatérgico.....	27
2.6 Liberação de glutamato por toxinas escorpionicas.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Material	31
3.1.1 Caracterização do café.....	31
3.1.2 Modelo experimental.....	31
3.1.3 Preparo da dieta com café	33
3.1.4 Reagentes	33
3.1.5 Soluções	34
3.1.6 Equipamentos	34
3.2 Métodos	35
3.2.1 Avaliação do consumo de ração e ganho de massa corporal	35
3.2.2 Determinação do conteúdo de glutamato liberado.....	35
3.2.2.1 A obtenção de sinaptossomos	35
3.2.2.2 A determinação do conteúdo protéico sinaptossomal.....	36
3.2.2.3 A liberação de glutamato	37
3.2.3 A obtenção da tityustoxina gama.....	38

3.2.4	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Consumo de ração e conseqüências da restrição e reconstituição de alimentos sobre a massa corporal.....	40
4.2	Conteúdo de glutamato liberado de sinaptossomos do córtex cerebral dos ratos dos grupos experimentais nas condições basais e estimuladas por tityustoxina gama	42
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÕES.....	47
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
8	APÊNDICE.....	58

LISTA DE TABELAS

1	Constituintes do café solúveis em água	17
2	Composição química das dietas (g/100g de ração)	33
3	Protocolo de leitura de glutamato.....	38
4	Peso médio aos 120 dias de vida dos animais normonutridos, desnutridos e desnutridos com recuperação alimentar.....	41
A.1	Consumo de ração dos animais normonutridos, desnutridos e desnutridos com recuperação alimentar.....	57
A.2	Peso aos 120 dias de vida dos animais normonutridos, desnutridos e desnutridos com recuperação alimentar.....	58
A.3	Evolução do peso corporal dos animais normonutridos, desnutridos e desnutridos com recuperação alimentar.....	60
A.4	Conteúdo de glutamato liberado de sinaptossomos de córtex de ratos por estímulo com tityustoxina gama.....	60

LISTA DE FIGURAS

1	Consumo diário médio de ração por grupos de ratos controles e experimentais.....	41
2	Evolução do peso corporal dos grupos.....	43
3	Efeito da desnutrição, da dieta suplementada com café sobre o conteúdo de glutamato liberado.....	44
4	Conteúdo de glutamato liberado de sinaptossomos de córtex de ratos aos 120 dias de vida:.....	45

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ingestão de café sobre do sistema glutamatérgico estimulado por tityustoxina gama (TiTX- γ) proveniente do escorpião *Tityus serrulatus*, em ratos. Seis grupos de ratos Wistar foram utilizados: **NORM** (grupo normonutrido controle) recebeu ração de biotério para ratos, enriquecida com ração para cães; **NCAF** (grupo normonutrido café) foi alimentado com dieta do grupo normonutrido controle, acrescida de extrato aquoso de café; **DESN** (grupo desnutrido) foi alimentado com a quantidade de dieta correspondente a 60% de NORM; **DCAF** (grupo desnutrido café) recebeu a mesma dieta fornecida ao grupo desnutrido, acrescida de extrato aquoso de café; **DREC** (grupo desnutrido com recuperação alimentar) foi alimentado como DESN e a partir dos 60 dias foi alimentado *ad libitum*; **DRECAF** (grupo desnutrido café com recuperação alimentar) recebeu a mesma dieta de DREC contendo extrato aquoso de café. Os animais foram decapitados com 120 dias de vida e a fração sinaptossomal do córtex foi preparada. A liberação de glutamato foi medida por método fluorimétrico e os sinaptossomos foram incubados em meio de Krebs-Ringer-Hepes contendo 0,05 μ M da fração gama (TiTX- γ). O modelo de restrição alimentar promoveu diminuição no peso corporal (em g \pm EPM): NORM = 463,5 \pm 12,7; NCAF = 429,0 \pm 11,5; DESN = 294,8 \pm 4,9; DCAF = 293,3 \pm 5,1; DREC = 397,7 \pm 9,1 e DRECAF = 398,5 \pm 9,2 (P<0,05). O glutamato liberado após estímulo por toxina foi significativamente menor no grupo dos animais desnutridos e desnutridos com recuperação alimentar quando comparado com o grupo normonutrido controle (nmol/mg proteína \pm EPM): NORM = 3,11 \pm 0,55; NCAF = 1,99 \pm 0,27; DESN = 1,69 \pm 0,24; DCAF = 2,07 \pm 0,64; DREC = 1,96 \pm 0,36 e DRECAF = 1,44 \pm 0,10 (P<0,05). Concluiu-se que a desnutrição neonatal diminui irreversivelmente a liberação de glutamato em sinaptossomos após estímulo com toxina escorpiônica e que o café apresentou efeitos semelhantes, indicando provável modulação no sistema nervoso central.

Palavras chaves: desnutrição, café, glutamato, sinaptossomos e toxina escorpiônica.

ABSTRACT

The goal of the present work is, therefore, to evaluate coffee intake effect on the glutamatergic system stimulated by tityustoxin gamma (TiTX- γ), from scorpion venom *Tityus serrulatus*, in rats. Six groups of Wistar rats were utilized: **WNG** (Wellnourished control group) received rat lab chow diet, enriched with dog food; **WCOF** (Wellnourished group coffee) fed WNG diet, supplemented with aqueous coffee extract; **MNG** (Malnourished group) fed 60% of the amount given to WNG; **MCOF** (Malnourished coffee) fed 60% of the amount given to WCOF; **MREC** (Malnourished group feed recovered) fed as MNG up to 60 days of life and thereafter fed *ad libitum*; **MRECOF** (Malnourished group coffee and feed recovered) fed as MREC supplemented with aqueous coffee extract. The animals were decapitated at 120 days of life and the cortical synaptosomal fraction was prepared. Glutamate released was evaluated by fluorimetric method and the synaptosomes were incubated in Krebs-Ringer-Hepes medium containing 0.05 μ M tityustoxin gamma. The model of food restriction promoted a decrease in body weight (in g \pm SEM): WNG = 463.5 \pm 12.7, WCOF = 429.0 \pm 11.5, MNG = 294.8 \pm 4.9, MCOF = 293.3 \pm 5.1, MREC = 397.7 \pm 9.1 and MRECOF = 398.5 \pm 9.2 (P<0,05). Glutamate released after stimulus by the toxin was significantly less in the malnourished and feed recovered malnourished groups compared to wellnourished control (nmol/mg protein \pm SEM): WNG = 3.11 \pm 0.55, WCOF = 1.99 \pm 0.27, MNG = 1.69 \pm 0.24, MCOF = 2.07 \pm 0.64, MREC = 1.96 \pm 0.36 e MRECOF = 1.44 \pm 0.10 (P<0,05). It was concluded that neonatal malnutrition decreased irreversibly glutamate release from synaptosomes after scorpion toxin stimulus and that coffee presented similar effects, indicating probable modulation in the central nervous system.

Key words: malnutrition, coffee, glutamate, synaptosomes and scorpion toxin.

1) INTRODUÇÃO

A ingestão insuficiente de nutrientes nos seres vivos provoca efeitos fisiológicos e bioquímicos pronunciados. A desnutrição constitui um problema de saúde pública, ocorrendo isoladamente ou associada a outros fatores que aumentam a morbidade e a mortalidade (SANTOS-MONTEIRO *et al*, 2002).

A desnutrição no início da vida produz um impacto severo no desenvolvimento do organismo, tendo por resultado uma taxa reduzida da síntese da proteína na maioria dos tecidos do corpo, incluindo o sistema nervoso central (SANTOS & MORAES-SANTOS, 1979; PEDROSA & MORAES-SANTOS, 1987), ocasião na qual o crescimento e o desenvolvimento estão ocorrendo com grande intensidade, através dos processos de hiperplasia, hipertrofia e mielinização (KELLER *et al.*, 1982; SANTOS-MONTEIRO *et al*, 2002).

Além da evidenciada falta de nutrientes, a população mundial passou a ter hábitos desfavoráveis à saúde, como consumo excessivo de gorduras, principalmente saturadas, consumo excessivo de açúcar e sal e, ainda, diminuição considerável do consumo de amido e fibras dietéticas (CARVALHO *et al*, 2004). Dados epidemiológicos recomendam o consumo de frutas e verduras como medida preventiva para reduzir os riscos de diversas doenças degenerativas (DE ANGELIS, 2001).

Justamente para prevenir os riscos de doenças degenerativas e garantir o desenvolvimento e crescimento normal dos indivíduos, há um importante grupo de componentes dos alimentos que apresentam propriedades funcionais benéficas, além dos efeitos dos tradicionais nutrientes. Os alimentos funcionais possuem marcadores biológicos de sua função no organismo. Como benefícios para a saúde, desempenham papel na redução do risco de várias doenças (WAITZBERG, 2000), através de uma nutrição preventiva, iniciada logo após o desmame e continuada ao longo de toda a vida (DE ANGELIS, 2001).

Efeitos estimulantes e/ou antioxidantes, encontrados no café e em outros alimentos, produzem importantes relações benéficas para os indivíduos que tomam café

(YANAGIMOTO *et al.*, 2004). Esses efeitos, segundo CLARKE & MACRAE (1989), são reflexos da torrefação que altera a constituição química dos grãos, principalmente pela reação de Maillard, reação de Streeker e por processos de pirólise. Dentre as substâncias de alto peso molecular, produzidas pela reação de Maillard, estão as melanoidinas que possuem uma forte atividade antioxidante inibindo significativamente oxidação de lipídeos.

Em estudos anteriores realizados por GOMES (2004) e ABREU (2005) foi determinado que a ingestão de café na dieta promoveu uma redução no índice de peroxidação lipídica e um aumento no teor de glutathiona reduzida em ratos normonutridos como em desnutridos. RYAN *et al.* (2002) em estudo com idosos observaram relação direta entre consumo de café e resultados positivos em teste de memória verbal e de raciocínio espacial. Resultados de muitos estudos sugerem que a cafeína interfere no desempenho prejudicial produzido pela fadiga, por uma noite de trabalho e pela privação do sono, aumenta o estado de alerta e a ansiedade, melhora a atenção e a recuperação da memória (SMITH *et al.*, 2003). Além disso, estudos epidemiológicos e relatos retrospectivos relacionam o café e a cafeína à doença de Parkinson (BENEDETTI *et al.*, 2000; ROSS *et al.*, 2000; ASCHERIO *et al.*, 2001).

No cérebro, um neurônio pode ser afetado, simultaneamente, por estímulos excitatórios e inibitórios de axônios provenientes de muitos neurônios (POLLI LOPES *et al.*, 1999). A transmissão de impulsos através de sinapses envolve a liberação sincronizada de uma grande quantidade de neurotransmissores. O glutamato é uma das substâncias químicas que medeiam essa transmissão de informações (GUYTON, 1992).

O glutamato, neurotransmissor excitatório mais presente no cérebro de mamíferos, é um aminoácido não essencial que não atravessa a barreira hematoencefálica, por isso, não é fornecido ao cérebro pela circulação. No entanto é sintetizado nos terminais pré-sinápticos a partir da glutamina, por meio da ação da enzima glutaminase, podendo também provir do α -cetoglutarato aminotransferases (SCHOUSBOE *et al.*, 1999).

A transmissão glutamatérgica pode estar relacionada ao aprendizado, à memória (IZQUIERDO & MEDINA, 1997), aos processos plásticos no cérebro (OZAWA *et al.*, 1998), à transdução central e à fisiopatologia da morte neuronal após injúria cerebral (BUGGY *et al.*, 2000), à isquemia neural, à tolerância e à dependência de drogas, à dor

neuropática, à ansiedade, à depressão (CAROBREZ, 2003), à proliferação e migração celular (MCDONALD & JOHNSTON, 1990).

Para a elucidação da influência do café no sistema glutamatérgico, utilizamos sinaptossomos, preparação que tem sido usada desde a década de 60 para estudar as funções pré-sinápticas (DE ROBERTIS *et al.*, 1962; GRAY & WHITTAKER, 1962).

Para estimular a liberação do neurotransmissor foi utilizada tityustoxina-gama (TiTX- γ) da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* (MASSENSINI *et al.*, 1998).

Na presente dissertação de mestrado, o objetivo foi avaliar o efeito da ingestão de café sobre do sistema glutamatérgico estimulado por tityustoxina gama (TiTX- γ) em ratos normonutridos, desnutridos e desnutridos com recuperação alimentar após 60 dias de vida.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – CAFÉ, UM BREVE HISTÓRICO.

A planta de café é originária da Etiópia, região de Kaffa na África central, onde ainda hoje faz parte da vegetação natural. Os manuscritos mais antigos mencionando a cultura do café datam de 575 no Yêmen, onde, consumido como fruto in natura, passa a ser cultivado. A partir de 1615 o café começou a ser saboreado no Continente Europeu, trazido por viajantes em suas freqüentes viagens ao oriente. Até o século XVII, somente os árabes produziam café. Alemães, franceses e italianos procuravam desesperadamente uma maneira de desenvolver o plantio em suas colônias (ABIC, 2007).

O crescente mercado consumidor europeu propiciou a expansão do plantio de café em países africanos e a sua chegada ao Novo Mundo. Pelas mãos dos colonizadores europeus, o café chegou ao Suriname, São Domingos, Cuba, Porto Rico e Guianas. Foi por meio das Guianas que chegou ao norte do Brasil. Desta maneira, o segredo dos árabes se espalhou por todos os cantos do mundo. Em 1000 d.C., os árabes começaram a preparar uma infusão com as cerejas, fervendo-as em água. Somente no século XIV, o processo de

torrefação foi desenvolvido, e finalmente a bebida adquiriu um aspecto mais parecido com o dos dias de hoje (ABIC, 2007).

O sucesso da produção no Brasil deu-se no início do século XVIII, sendo cultivado no Vale da Paraíba em São Paulo. O clima e as terras férteis da região transformaram o Brasil no maior produtor mundial de café a partir do final do século XIX (ICO, 2003).

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo responsável por 30% do mercado internacional, volume equivalente à soma da produção dos outros seis maiores países produtores. É também o segundo mercado consumidor, atrás somente dos Estados Unidos (ABIC, 2007).

Seu mercado internacional movimenta anualmente recursos na ordem de 15 bilhões de dólares, sendo a planta mais consumida no mundo e o segundo maior mercado depois do petróleo. Pelo fato deste alto consumo mundial, as pesquisas relacionadas às atividades biológicas do café verde e especialmente do café torrado foram intensamente estimuladas (ABIC, 2007).

O consumo do café no mundo está aumentando. O consumo médio do café em 1990 foi de 1,41 xícara/dia no Japão, 1,73 xícara/dia nos Estados Unidos e 3,87 xícaras/dia na Alemanha (1 xícara equivale a 150 mL). Os resultados de uma pesquisa realizada na França indicam o que mais acentua o consumo do café, seria o seu fator estimulante e o seu paladar forte característico (NEHLIG, 1999).

2.1.1 – CAFÉ COMO ALIMENTO FUNCIONAL

Historicamente, a alimentação de populações vivendo em países industrialmente desenvolvidos apresenta tendências desfavoráveis como o excessivo consumo de gorduras, principalmente saturadas, excessivo consumo de açúcar e sal e, ainda, diminuição considerável do consumo de amido e fibras dietéticas (CARVALHO *et al*, 2004). O consumo de frutas e verduras tem sido recomendado como medida preventiva para reduzir os riscos de diversas doenças degenerativas (DE ANGELIS, 2001).

Nutrientes são necessários para o desenvolvimento e crescimento normais dos indivíduos. Também é preciso proteger os indivíduos contra os riscos de origem genética e do meio ambiente, incluindo os hábitos alimentares, minimizando riscos pela nutrição preventiva, iniciada logo após o desmame e continuada ao longo de toda a vida. Obviamente, que não se proíbe o consumo de alimentos menos recomendados, mas é necessária a moderação. É neste ponto que outros componentes dos alimentos, não somente os nutrientes tradicionais devem também, fazer parte da alimentação. Estes compostos que existem e que não são os nutrientes clássicos apresentam propriedades funcionais benéficas e devem ser consumidos normalmente (DE ANGELIS, 2001).

Os alimentos funcionais, como benefício para a saúde, desempenham papel na redução do risco de várias doenças, tais como infecções intestinais, doenças cardiovasculares, câncer, obesidade e diabetes tipo 2, não insulina dependente (WAITZBERG, 2000).

Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção de alimentos, lançada pelo Japão na década de 80, através de um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (ANJO, 2004).

Efeitos estimulantes e/ou antioxidantes podem ser encontrados no café e em diversas plantas, frutas, suco de frutas e vegetais, feijões e chá (YANAGIMOTO *et al*, 2004).

Em relação ao café, CLARKE & MACRAE (1989) relataram que o processo de torrefação dá origem às mudanças que lhe conferem gosto agradável e aroma característico,

produzindo uma das bebidas mais populares do mundo. Este processo altera a constituição química dos grãos, principalmente pela reação de Maillard, reação de Streeker e por processos de pirólise envolvendo substâncias de alto e baixo peso molecular, alterando a concentração e a estrutura química de diversas substâncias presentes. No primeiro grupo, estão as proteínas e os polissacarídeos e, no segundo grupo, a cafeína, a trigonelina, o ácido clorogênico, o ácido caféico e a sacarose (CLARKE & MACRAE, 1989). Segundo os mesmos autores, em ordem de abundância, os teores dos constituintes do café, solúveis em água, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1- Constituintes do café solúveis em água

	Polímeros Fenólicos	Polissacarídeos	Ácidos clorogênicos	Outros ácidos orgânicos	Minerais	Cafeína	Açúcares	Lipídeos
Percentual (%)	8,0	6,0	4,0	0,5	3,0	1,0	0,3	0,2

Fonte: CLARKE & MACRAE, 1989

Dentre as substâncias de alto peso molecular, produzidas pela reação de Maillard, estão as melanoidinas que possuem uma forte atividade antioxidante inibindo significativamente oxidação de lipídeos. Mais de 300 compostos heterocíclicos foram identificados no café incluindo *pirróis*, furanos, *tiazóis*, tiofenóis, imidazóis e pirazinas. Os *pirróis* e furanos são voláteis e possuem atividade antioxidante quase iguais ao α -tocoferol (YANAGIMOTO *et al*, 2004).

Outros estudos realizados mostraram que a ingestão de café na dieta provocou uma redução no índice de peroxidação lipídica e um aumento no teor de glutathione reduzida tanto em ratos normonutridos quanto desnutridos (GOMES, 2004; ABREU, 2005).

Está descrito na literatura que a cafeína excita o sistema nervoso central, age sobre o sistema muscular circular, principalmente sobre o músculo cardíaco. Em pequenas doses, ela diminui a fadiga sendo prejudicial se for ingerida em excesso (SALDAÑA *et. al*, 1997).

A cafeína diminui o desempenho prejudicial produzido pela fadiga, por uma noite de trabalho e pela privação do sono, aumenta o estado de alerta e a ansiedade, melhora a atenção e a recuperação da memória (SMITH *et al.*, 2003).

2.1.2 – CAFÉ E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Há relatos de que o aroma do café afeta as ondas do cérebro e o fluxo sanguíneo (YAMATO *et al.*, 2002). A cafeína, dentre os vários componentes do café, é absorvida até o sangue e tecidos corporais com 5 minutos após a ingestão. Em aproximadamente 30 minutos, a concentração de cafeína alcança seu pico no sangue com uma meia-vida de mais ou menos 4 horas. A cafeína, como uma leve estimulante, afeta o cérebro aumentando a atividade neural (PAPADELIS *et al.*, 2003). Em idosos, o consumo de café melhorou a memória verbal e de raciocínio espacial (RYAN *et al.*, 2002).

Embora a ação primária da cafeína seja bloquear receptores de adenosina, isso leva a um segundo efeito muito importante sobre muitas classes de neurotransmissores incluindo adrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, glutamato e GABA (FREDHOLM & SOLLEVI, 1999), influenciando um grande número de diferentes funções fisiológicas. O papel da adenosina no sistema nervoso central é agir como um regulador da atividade central, diminuindo os disparos neuronais e inibindo a liberação de vários neurotransmissores, como, dopamina, serotonina, GABA, acetilcolina e noradrenalina através dos receptores pré-sinápticos (SMITH *et al.*, 2003); foram descritos quatro receptores para essa substância: A1, A2a, A2b e A3.

Outros estudos afirmam que os potenciais benefícios neuroprotetores dos antagonistas dos receptores A2a, como a cafeína, poderiam ser empregados na melhora dos sintomas e no tratamento da doença de Parkinson (SCHWARZSCHILD *et al.*, 2003). E conclui afirmando que os antagonistas poderão não somente aliviar os sintomas, mas também retardar o progresso da doença. Esses receptores atuam em conjunção com os receptores dopaminérgicos D2, e a cafeína, ao bloquear os receptores A2a, permite que os receptores D2 sejam estimulados, assim aumentando a atividade motora. O estímulo da neurotransmissão dopaminérgica ocorreria pelo aumento da ligação de dopamina a receptores dopaminérgicos D2 (FERRÉ *et al.*; 1992; SELF, 1996).

Em um estudo que envolveu a técnica de microdiálise, YAMATO *et al* (2002) observaram que a injeção intraperitonealmente em animais com café (33mg/Kg) ou cafeína (1,7 mg/Kg), quantidade equivalente a uma xícara de 150 ml de café, apresentavam uma diminuição significativa de liberação de serotonina no hipocampo e no *striatum* em momentos de estresse. Segundo os mesmos autores, este resultado pode ser explicado devido a não seletividade da cafeína nos receptores de adenosina, observando uma maior probabilidade de uma antagonização efetiva no receptor A2 do que nos receptores A1 e A3.

Diante do exposto, a cafeína tem sido relacionada com um risco reduzido de desenvolvimento de doença de Parkinson em vários estudos epidemiológicos prospectivos (ROSS *et al.*, 2000; ASCHERIO *et al.*, 2001) e múltiplos relatos retrospectivos (BENEDETTI *et al.*, 2000). A incidência de Parkinson declina com o aumento nos níveis de consumo de café ou cafeína.

2.2 – SINAPSES E O SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

O sistema nervoso regula todos os aspectos das funções do corpo humano e a sua complexidade parece infinita. Bilhões de neurônios agrupados para diferentes funções regulam, constantemente, o meio interno de nosso organismo e a influência do universo exterior: luz, tato, pressão, som, equilíbrio, imagens, concentrações de muitas substâncias, dor, emoção, consciência. Grupos de neurônios interagem e transmitem a informação resultante a outros grupos para que ela seja processada e armazenada. Mediante o mesmo processo, outros neurônios regulam a contração dos músculos e a secreção das glândulas endócrinas e exócrinas. O cérebro, o centro de controle que armazena, computa, integra e transmite a informação, contém milhões de neurônios e cada um deles forma conexões, chamadas sinapses, com até duzentos mil outros neurônios (KUFLER *et al*, 1984).

Um neurônio pode ser afetado, simultaneamente, por estímulos excitatórios e inibitórios de axônios provenientes de muitos neurônios. Os diferentes sinais diminuem ou aumentam o potencial que se movimenta ao longo da membrana plasmática, a partir do ponto de sinapse para o corpo celular, e daí para o cone axonal. A partir daí, um novo potencial de ação será gerado ou não, dependendo do balanço de tempo, amplitude, e

localização dos vários potenciais excitatórios e inibitórios, recebidos pelo neurônio (POLLI LOPES *et al.*, 1999).

A transmissão química envolve dois tipos distintos de especializações neuronais, os compartimentos pré - e pós-sinápticos. A liberação de neurotransmissor (NT) no seu sítio intracelular no terminal pré-sináptico ocasiona resposta em estruturas pós-sinápticas através do espaço intersináptico ou fenda sináptica (FS) (POLLI LOPES *et al.*, 1999). A transmissão de impulsos através de sinapses envolve a liberação sincronizada de uma grande quantidade de neurotransmissores. O transmissor, por sua vez, age sobre proteínas receptoras localizadas na membrana do neurônio posterior excitando-o, inibindo-o ou modificando sua sensibilidade de alguma maneira. O glutamato e a acetilcolina são duas dessas substâncias químicas que medeiam essa transmissão de informações (GUYTON, 1992).

Há dois tipos de sinapse, elétricas e químicas, que diferem em estrutura e função. Os neurônios que se comunicam mediante sinapses elétricas são conectados por junções comunicantes (gap junction) através das quais os impulsos elétricos passam entre células. A vantagem das sinapses elétricas é a velocidade, já que o impulso direto evita a demora ao redor de 0,5 ms, característica das sinapses químicas. A sinapse química, base funcional do sistema nervoso, é uma estrutura especializada e auto-regulada. É integrada por um terminal pré-sináptico, o botão terminal, e uma área correspondente do neurônio pós-sináptico, que contém parte da densidade sináptica, receptores para neurotransmissores e canais iônicos pós-sinápticos. O terminal pré-sináptico contém as vesículas sinápticas, que carregam neurotransmissores específicos, e a membrana com os canais pré-sinápticos. Cada vesícula sináptica consta de um aparelho protéico, formado por mais de trinta proteínas específicas para produzir fusão de suas membranas com a membrana pré-sináptica e secretar o NT. Imediata endocitose é produzida para reciclar a membrana e os componentes não utilizados do NT. A fusão é um processo muito rápido, medido em fração de milissegundos, produzido pelo potencial de ação pré-sináptico, quando os canais, operados por voltagem, permitem rápida e passageira entrada de Ca^{2+} no terminal. Este cálcio interage com várias proteínas da membrana vesicular (POLLI LOPES *et al.*, 1999), o que provoca, por exocitose Ca^{2+} -dependente, a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica. A exocitose do neurotransmissor também ocorre *in vitro*, em meios ausentes de

Ca^{2+} , por um mecanismo de transporte reverso na membrana citoplasmática (NICHOLLS, *et al* 1997). Segundo o mesmo estudo, a preincubação dos sinaptossomos em 30 graus centígrados por 2 horas antes que a despolarização conduz a uma diminuição na liberação de glutamato Ca^{2+} -independente e a um aumento na liberação de Ca^{2+} -dependente, devido a uma recolocação intrasinaptossomal do aminoácido.

O neurotransmissor ligar-se-á a sítios receptores da membrana do neurônio pós-sináptico, transmitindo desta forma o impulso nervoso. No cérebro humano, a comunicação entre os neurônios se dá por contatos sinápticos que utiliza na sua maior parte, os aminoácidos como transmissores (NICHOLLS, 1993).

Os terminais pré-sinápticos têm diversas formas anatômicas que lembram pequenos botões redondos ou ovais que apresentam duas estruturas internas importantes: as vesículas sinápticas (VS) e as mitocôndrias. As VS armazenam a substância transmissora excitatória ou inibitória e mitocôndrias que fornecem ATP (trifosfato de adenosina), necessário para a síntese de mais substâncias transmissoras (GUYTON, 1992).

O tamanho das VS varia, dependendo do tipo de NT contido no seu interior. Existem dois tipos de vesículas: as de centro denso (VCD) e as pequenas de centro claro (VP). A VCD apresenta uma região central, elétron-densa, e são subdivididas em dois tipos: pequenas, 80 nm, que contêm catecolaminas e grandes, 200 nm, que contêm neuropeptídeos. As VP são elétron-lúcidas, diâmetro de 50 nm e contêm um tipo de NT de ação rápida que pode ser acetilcolina, glicina, GABA ou glutamato. Estas vesículas não estão distribuídas uniformemente no citoplasma pré-sináptico, estando, a maioria, reunida a uma distância de aproximadamente 0,5 μm da membrana, próximo à zona ativa. Quando um potencial de ação alcança o terminal, é esperado que, pelo menos, alguma vesícula se funda com a membrana pré-sináptica. Após a fusão, a membrana da vesícula torna-se parte da membrana pré-sináptica, sendo endocitada para reutilização (POLLI LOPES *et al.*, 1999).

O glutamato é um aminoácido não essencial que não atravessa a barreira hematoencefálica, por isso, não é fornecido ao cérebro pela circulação. No entanto ele é sintetizado nos terminais pré-sinápticos a partir da glutamina, por meio da ação da enzima glutaminase e α -cetoglutarato aminotransferases e armazenado em vesículas (SCHOUSBOE *et al.*, 1999). A captação vesicular é Na^{+} -independente por ação de

transportadores de membrana, sendo sua incorporação possível devido a um potencial interno de membrana positivo que é gerado por uma H⁺-ATPase vacuolar, a qual medeia o transporte de H⁺ para dentro da vesícula (NAITO & UEDA, 1985). As enzimas de síntese e degradação do glutamato têm sido encontradas predominantemente nos neurônios e nas células gliais, dois principais componentes do encéfalo (DINGLELINE & McBAIN, 1994).

Nos neurônios glutamatérgicos, o glutamato está em grandes concentrações por toda extensão celular, mas ele é particularmente abundante na região pré-sináptica, onde existem as vesículas carregadas com neurotransmissores que serão liberados mediante estímulo (ERECINSKA & SILVER, 1990; MASSENSINI, 1996).

A liberação de glutamato na sinapse é processada de duas formas: via exocitose de vesículas carregadas com o neurotransmissor e que depende de íons cálcio (SANCHEZ-PRIETO *et al.*, 1987) e via cálcio independente que ocorre pela reversão do transportador de membrana de alta afinidade, liberando glutamato do pool citoplasmático (ROMANOSILVA *et al.*, 1994).

Na despolarização dos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos, ocorre a liberação do glutamato das vesículas para a fenda sináptica por exocitose dependente da concentração de cálcio citossólico (VESCE *et al.*, 1999), interagindo com receptores glutamatérgicos (GluRs) ionotrópicos (iGluRs) e/ou metabotrópicos (mGluRs) localizados nas membranas pós-sinápticas e gliais (GALLO & GHIANI, 2000; MELDRUM, 2000). A concentração de glutamato na sinapse no período pré-liberação é de 2-5 µmol/L, podendo chegar a 5-100 µmol/L depois da despolarização (DAIKHIN & YUDKOFF, 2000).

A captação de glutamato tem vital importância na manutenção de baixas concentrações extracelulares deste neurotransmissor (ANDERSON & SWANSON, 2000; DAIKHIN & YUDKOFF, 2000) além de prover glutamato para a síntese de GABA (TILLAKARATNE *et al.*, 1995). A captação de glutamato desempenha papel importante como acoplador da atividade neuronal com o metabolismo da glicose em astrócitos (MAGISTRETTI *et al.*, 1999). Após a captação astrocitária, o glutamato é transformado pela glutamina sintetase em glutamina. Esta é transportada para os neurônios, convertida pela glutaminase a glutamato, que pode ser captado pelas vesículas sinápticas e liberado novamente, recomeçando o processo (SCHOUSBOE *et al.*, 1999; ANDERSON & SWANSON, 2000; AMARAL & FONTANA, 2002). A regeneração do glutamato a partir

da glutamina fecha o ciclo glutamato-glutamina, o qual promove: rápida remoção do glutamato da sinapse; conversão no astrócito do glutamato em glutamina, um composto não neuro-ativo, mas que permite a volta do glutamato para os neurônios; provisão dos neurônios com substrato metabólico, uma vez que a glutamina pode ser utilizada como fonte energética em potencial; tamponamento da amônia, substância potencialmente neurotóxica, via glutamina sintetase (DAIKHIN & YUDKOFF, 2000).

A neurotransmissão glutamatérgica também desempenha papel crucial no desenvolvimento e manutenção de crises convulsivas, as quais estão presentes no fenômeno epiléptico. Além disso, pronunciada liberação de glutamato seguida da ativação de receptores (NMDA), (AMPA) e kainato assim como os receptores metabotrópicos vêm sendo associados à excitotoxicidade provocada pelo glutamato e morte neuronal em várias estruturas durante o *status epilepticus* (MILLAN *et al.*, 1993).

Diversos estudos investigam a transmissão glutamatérgica relacionando-a com patologias. CAROBREZ (2003) relata que dados pré-clínicos em roedores e humanos têm mostrado que compostos que reduzem a ativação do glutamato, pelo bloqueio dos seus receptores ou através da redução da sua liberação dos terminais, produzem um perfil ansiolítico em modelos de ansiedade. Já BRANDÃO (2000) sugere que um acúmulo de glutamato na fenda sináptica pode levar ao surgimento do *Delirium hipotivo* (distúrbio da memória, imaginação e pensamento) em ocasiões de encefalopatia hepática. HANDLEY *et al* (2006) associaram a toxicidade do glutamato à Doença de Huntington - doença genética neurodegenerativa, com quadros de ansiedade, depressão, e apatia. E ainda, HELFENSTEIN JR *et al.* (2006) associam a fibromialgia, síndrome clinicamente definida, mas de etiopatogenia obscura a um distúrbio complexo da neuromodulação da dor, envolvendo principalmente o sistema nervoso central (SNC) que poderia ser caracterizado por uma disfunção neuro-hormonal que incluiria uma deficiência de neurotransmissores inibitórios em níveis espinhais ou supraespinhais (serotonina, encefalina, norepinefrina e outros), ou uma hiperatividade de neurotransmissores excitatórios (substância P, glutamato, bradicinina e outros peptídeos) ou ainda ambas as condições poderiam estar presentes.

2.3 – RECEPTORES DE GLUTAMATO

O glutamato é o mais abundante aminoácido excitatório neurotransmissor no sistema nervoso central de mamíferos atuando em receptores metabotrópicos (mGluRs) acoplados a proteína G, modulando a produção de segundos mensageiros e são divididos em 8 subtipos (mGluR1-8) (OZAWA *et al.*, 1998). Os mGluR1 e mGluR5 (Grupo I) são ligados via proteínas G à ativação da fosfolipase C. Os mGluR2 e mGluR3 (Grupo II) e os mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8 (Grupo III) estão negativamente correlacionados à ativação da adenilato ciclase (CHAPMAN, 2000).

Já os receptores ionotrópicos (iGluRs), responsáveis pela iniciação, propagação e amplificação do sinal glutamatérgico (COTMAN *et al.*, 1995), são canais iônicos cátion-específicos e são subdivididos em três subtipos: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), kainato (os quais estão associados a canais independentes de voltagem e são permeáveis a Na^+ e K^+ , sendo que algumas subunidades são permeáveis ao Ca^{+2}) e N-metil-D-aspartato (NMDA) que são dependentes de voltagem, altamente permeáveis ao Ca^{+2} e de baixa permeabilidade ao Na^+ e K^+ , mediando a transmissão sináptica lenta. Sendo os dois primeiros denominados coletivamente de receptores não-NMDA (OZAWA *et al.*, 1998).

O canal do receptor NMDA é bloqueado por Mg^{2+} em neurônios em potencial de repouso, e a ativação deste receptor só ocorre se a membrana neural for previamente despolarizada pela ativação dos receptores AMPA, permitindo a saída do Mg^{2+} do interior do canal (EDMONS *et al.*, 1995). A ativação do receptor NMDA contribui para a plasticidade neuronal e para a indução da potenciação de longa duração (LTP) e, por outro lado, a sua estimulação excessiva leva ao aumento de Ca^{+2} intracelular e morte celular (MODY & MACDONALD, 1995).

Os receptores NMDA são encontrados tanto em células neuronais quanto gliais (CONTI *et al.*, 1997). A expressão de suas subunidades varia muito no SNC, sendo o hipocampo e o córtex cerebrais, estruturas particularmente ricas neste receptor (WATKINS *et al.*, 1990).

2.4 – SINAPTOSSOMOS

Os sinaptossomos são estruturas vesiculares obtidas a partir de membranas de terminais sinápticos, contendo os componentes necessários para a realização dos processos de exocitose e endocitose como vesículas sinápticas, componentes de citoesqueleto e mitocôndrias. O processo básico de isolamento das frações sinaptossomais foi descrito pela primeira vez por DE ROBERTIS (1962) e por GRAY e WHITTAKER (1962). O processo consistia na preparação de um homogeneizado de tecido, que era submetido sucessivamente a centrifugações diferenciais, seguidas por uma centrifugação num gradiente preparado com soluções de sacarose com diferentes concentrações. Este processo permitia isolar os sinaptossomos, eliminando as mitocôndrias e a mielina.

As preparações sinaptossomais têm sido usadas desde a década de 60 como modelo para elucidar fenômenos que dizem respeito à produção e liberação de neurotransmissores (DUNKLEY *et al*, 1988). Os sinaptossomos apresentam-se com diâmetro de 0,5 a 1,0 μm , constituídos por uma ou menores mitocôndrias e uma grande concentração de vesículas sinápticas presentes na região da zona ativa (NICHOLLS, 1993).

Para o isolamento desses sinaptossomas após a homogeneização de áreas definidas do cérebro, NICHOLLS (1993), obteve sucesso no procedimento resultando na homogeneidade das estruturas viáveis no processo de separação e também, caracterizando subpopulações morfológica e quimicamente distintas. Essa preparação sinaptossomal pode ser mantida no gelo por até 6 horas sem perda da capacidade de manutenção dos níveis de ATP, o gradiente iônico ou a liberação de neurotransmissores detendo toda a maquinaria pré-sináptica de produção, estocagem e liberação de neurotransmissores (NICHOLLS, 1993).

Os sinaptossomos podem utilizar a glicose como fonte bioenergética e também usar como metabólico o piruvato. O isolamento desses terminais nervosos intactos, e ainda a identificação e caracterização de proteínas do terminal pré-sináptico são os meios utilizados para elucidar a questão da transmissão sináptica (NICHOLLS, 1993).

2.5 – DESNUTRIÇÃO

As deficiências nutricionais decorrentes da insuficiente ingestão de macro e/ou micronutrientes levam a graus variáveis de desnutrição, reconhecidamente um grave problema mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. Quando incide em crianças, constitui um problema de saúde pública, ocorrendo isoladamente ou associada a outros fatores que aumentam a morbidade e a mortalidade (SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2002). A desnutrição ocorre quando o organismo não recebe os nutrientes necessários para a manutenção das suas funções metabólicas, em decorrência da ingestão insuficiente de alimentos ou de problemas na utilização do que lhe é ofertado (WHO, 2000).

Utiliza-se a expressão desnutrição energético-protéica (DEP) para descrever um espectro de quadros clínicos que incluem o kwashiorkor e o marasmo bem como as formas mais leves e moderadas que são suas precursoras. O termo kwashiorkor pode ser entendido de duas formas distintas: como sinônimo de desnutrição edematosa ou como a síndrome clínica que ocorre em crianças entre um e quatro anos de idade e que inclui alterações na pele e mucosas, no cabelo e no humor, bem como infiltração gordurosa do fígado. O marasmo ocorre principalmente em crianças com menos de um ano de vida, que deixam de receber o leite materno ou recebem de forma insuficiente os seus substitutos. Estas crianças não apresentam edema, mostram-se bastante emagrecidas, com pele fina e enrugada, com perda da elasticidade, porém sem lesões cutâneas. Além disso, são crianças inquietas com olhar vivo e choro constante por fome (WATERLOW, 1992). Em outra definição, marasmo é uma deficiência crônica de energia e, em estados avançados, é caracterizado por perda de massa muscular e ausência de gordura subcutânea (CASTIGLIA, 1996).

O modelo experimental de desnutrição crônica precoce, por restrição da ingestão de alimento, é o mais semelhante ao que acontece na nossa população infantil, a desnutrição protéico-calórica nos dois primeiros anos de vida, iniciando após o término do aleitamento materno (NUNES *et al.*, 2002).

A desnutrição no início da vida produz um impacto severo no desenvolvimento do organismo, tendo por resultado uma taxa reduzida da síntese da proteína na maioria dos tecidos do corpo (KELLER *et al.*, 1982; PEDROSA & MORAES-SANTOS, 1987).

A restrição alimentar precoce ocasiona seqüelas em vários órgãos e sistemas dependendo dos moldes, quantidades e períodos da vida utilizados. Quando afeta o período de desenvolvimento do animal, pode levar a efeitos irreversíveis em maior extensão que aquela imposta após a maturidade. Quando esta restrição é realizada no período de divisão celular, os animais não alcançam os níveis normais de peso corporal e de tamanho de alguns órgãos, mesmo após uma recuperação nutricional (WINICK & NOBLE, 1966).

2.5.1- DESNUTRIÇÃO E SISTEMA NERVOSO

No que se refere ao sistema nervoso central, a deficiência nutricional no início da vida é mais grave, principalmente porque nesta fase o crescimento e o desenvolvimento estão ocorrendo com grande intensidade, através dos processos de hiperplasia, hipertrofia e mielinização. A neurogênese, glicogênese e a migração neuronal realizam-se, então, com velocidade máxima, provocando um rápido aumento do peso cerebral. Por esse motivo, essa fase é denominada PCRC (período de crescimento rápido do cérebro). É considerado, como um dos períodos críticos mais importantes para o desenvolvimento cerebral, por ser uma etapa de grande vulnerabilidade a vários tipos de agressão, inclusive a nutricional. (SANTOS-MONTEIRO *et al*, 2002). Segundo os mesmos autores, o PCRC ocorre em épocas distintas nas diversas espécies animais. Assim, nos seres humanos, inicia-se no período pré-natal (último trimestre de gestação) continuando até os primeiros anos de vida (dois a quatro anos); na cobaia, correspondente a vida pré-natal, no rato e no cão, ocorre no período de aleitamento.

Inúmeros estudos têm demonstrado uma estreita associação entre a ocorrência da desnutrição protéico-calórica grave e o prejuízo para o desenvolvimento do cérebro, com conseqüente alteração do seu funcionamento (BALLABRIGA, 1989 & PICANCO-DINIZ *et al*, 1998).

Em animais de laboratório, a desnutrição protéica em idades precoces provoca alterações no tecido nervoso, tais como: diminuição nos teores de glicogênio e glicose cerebrais; aumento da produção de corpos cetônicos, aumento na concentração de ácido glutâmico e glutamina. A carência nutricional imposta durante a gestação acarreta, nos

filhotes, a diminuição de DNA e das proteínas cerebrais, bem como alterações das taxas de divisão celular, resultando em redução no número final de células nervosas (SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2002).

No período de aleitamento, a desnutrição leva a uma diminuição do peso do cerebelo, do hipocampo e do córtex cerebral, evidenciando-se uma maior vulnerabilidade destas estruturas (FULLER & WIGGINS, 1984).

Dentre as alterações que podem ocorrer no córtex destacamos a interrupção do desenvolvimento de células piramidais, a diminuição nas dimensões de células corticais, a redução da densidade das espinhas dendríticas e a diminuição da complexidade da ramificação dendrítica do córtex e do número total de células gliais. Embora a densidade das sinapses corticais não pareça ser afetada, o número total de sinapses do córtex visual é claramente reduzido pela desnutrição (HAZIN, 2006).

Durante o período de rápido crescimento do cérebro, a taxa de biossíntese de proteínas está aumentada em cinco vezes quando esta é comparada com animais adultos (LAJTHA *et al.*, 1979). No entanto, a biossíntese de proteínas pode ser bloqueada pela desnutrição, conforme estudos prévios realizados em animais experimentais submetidos à restrição de alimentos. Como resultado destes estudos, foi encontrada uma menor taxa de biossíntese de proteínas no grupo de animais desnutridos, em estudos *in vitro* (MORAES-SANTOS, 1981), *ex vivo* (SANTOS & MORAES-SANTOS, 1979), e estudos *in vivo* (PEDROSA & MORAES-SANTOS, 1987; REZENDE, 2006).

Nos animais subnutridos, o córtex cerebral tem mais de 40% de perda das sinapses (MORGAN & WINICK, 1985), o que explicaria o prejuízo na transmissão de informações (DYSON & JONES, 1976), uma vez que a quantidade de neurotransmissores estaria diminuída. Essas alterações, acontecidas em decorrência da restrição alimentar precoce de ratos, não podem ser revertidas inteiramente pela reabilitação nutricional, deixando seqüelas permanentes (PEDROSA & MORAES-SANTOS, 1987).

Modelos de desnutrição animal durante o período pré-natal levam à alteração do desenvolvimento pós-natal do cérebro apesar da reabilitação nutricional ao nascimento. Alterações no comportamento, anatomia, química e fisiologia estendem-se após o período pós-natal, permanecendo até a vida adulta (FIACCO *et al.*, 2003).

2.6 - LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO POR TOXINAS ESCORPIÔNICAS

O veneno de escorpião consiste de uma complexa mistura de proteínas farmacologicamente ativas. Mesmo sendo de diferentes gêneros e espécies, esses escorpiões apresentam propriedades muito comuns entre eles, especialmente, a presença de componentes tóxicos (SAMPAIO *et al.*, 1983).

O veneno do escorpião *Tityus serrulatus* é uma mistura de peptídeos tóxicos e não tóxicos além de serotonina, nucleotídeos, aminoácidos, enzimas líticas (hialuronidase) e lipídeos (POSSANI *et al.*, 1981). As frações tóxicas do veneno de *T. serrulatus* começaram a ser purificadas em 1966 (GOMEZ & DINIZ), por processo posteriormente modificado por SAMPAIO *et al.* (1983), utilizando cromatografia líquida de filtração molecular e troca iônica. Deste processo são obtidas duas frações tóxicas principais: a TiTX- γ (tityustoxina gama) e a TsTX (tityustoxina).

Tityustoxina mimetiza muitos efeitos do estímulo elétrico aumentando a captação de sódio e cálcio (SALGADO, 2006).

A tityustoxina gama (TiTX- γ) é um polipeptídeo composto de uma cadeia de 61 aminoácidos. O principal efeito da toxina é a alteração que ela exerce sobre os canais de Na⁺ voltagem-dependente. Essa toxina cria um constante movimento de íons Na⁺ para dentro do terminal nervoso promovendo a alteração do potencial de membrana. Com essa alteração, ocorre a abertura dos canais de sódio, anteriormente em repouso, e a liberação desses íons no espaço intracelular. Os canais de Ca²⁺ - voltagem-dependente, por sua vez, são abertos, os íons migram, e a concentração interna de Ca²⁺ é aumentada, como descreve ROMANO-SILVA *et al.* (1994). Os íons Ca²⁺ se ligam as moléculas protéicas na superfície da membrana do neurônio pré-sináptico, e a aproximação com a vesícula sináptica acontece, e para que ocorra fusão, há abertura da vesícula e, por exocitose, a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica. Por causa do aumento provocado na ação desses canais de Na⁺, a TiTX- γ é considerada um marcador por excelência, desses sistemas de

portões envolvidos na atividade biológica (LAZDUNSKI *et al.*, 1986; MASSENSINI, 1996).

DRUMOND *et al.* (1995) observaram efeitos diferenciados das frações TiTX- γ e TsTX em átrios isolados de ratos. O acréscimo de TiTX- γ ao banho provocou uma redução inicial tanto na força de contração (efeito ionotrópico) quanto na frequência de contração atrial (efeito cronotrópico). Novas adições desta toxina após 30 ou 60 minutos não produziram novas alterações, sugerindo uma alta afinidade de ligação. Já a adição de TsTX provocou também aumento na força de contração e na frequência, e quando adicionada novamente após 30 minutos reproduziu estes efeitos.

MASSENSINI *et al.* (1998), estudando as frações TiTX- γ e TsTX em sinaptossomos corticais de ratos, observaram um aumento tanto nas concentrações de Na⁺ e Ca²⁺ intrassinaptossomais, quanto na liberação de glutamato, induzidos de forma dose-dependente pela TsTX. As frações TiTX- γ produziram igualmente um aumento dose dependente na liberação de glutamato. Observou, ainda, que uma concentração de apenas 0,05 μ M de TiTX- γ foi suficiente para liberação máxima de glutamato que equivale estatisticamente à liberação estimulada com KCl (33 mM) em preparação sinaptossomal de córtex de ratos. No mesmo estudo os autores observaram que em meios ausentes de Ca²⁺ houve uma liberação menor, mesmo que significativa, do neurotransmissor quando comparadas a meios com este mineral. Este resultado demonstra a eficiência desta toxina na liberação de glutamato em sinaptossomos de córtex de ratos.

Portanto, o estudo dessa toxina é de particular interesse em canais de sódio de membranas excitáveis e por causa dessa afinidade, ela tem sido utilizada em experimentos bioquímicos (LAZDUNSKI *et al.*, 1986).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – MATERIAL

3.1.1 – CARACTERIZAÇÃO DO CAFÉ

O café utilizado foi da espécie *Coffea arabica*, torrado a uma temperatura de 160 °C em um tempo aproximado de 13 minutos e foi comparada a torra no colorímetro da marca AGTRON da SCAA (Specialty Coffe Association of America) na classificação 45 ideal para consumo. A amostra utilizada foi do tipo exportação, grão sem defeito, granulação média e de processo de preparo natural de bebida mole. A extração foi feita de acordo com VITORINO *et al.* (2001) com algumas modificações. Um volume de 1000 mL de água destilada (90 °C), aquecida em chapa elétrica, foi vertido lentamente sobre a amostra do café moído (80 g) e a suspensão obtida foi agitada por 2 minutos. A amostra foi resfriada em água à temperatura ambiente por 10 minutos. O extrato foi então centrifugado (centrífuga refrigerada Hitachi modelo CR-21, cidade Hitachinaka, Japão) a 1200 g por 10 minutos a 8 °C. E o sobrenadante foi utilizado no preparo da ração com café.

3.1.2 – MODELO EXPERIMENTAL

O modelo experimental está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal conforme projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) sob o protocolo nº 136/05.

Ratos da raça Wistar, da colônia do Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG, foram acasalados e, por volta do 18º dia de prenhez, determinada por esfregaço vaginal, as fêmeas foram transferidas para gaiolas individuais e divididas aleatoriamente em seis grupos: um grupo normonutrido que recebeu dieta composta por ração de biotério (Labina, Brasil) e ração para cães (Bonzo Mix Carnes - SP, Brasil); um grupo normonutrido que recebeu a ração anterior acrescida de extrato aquoso de café; um grupo de desnutridos que receberam 60% da ração consumida pelo grupo

normonutrido e um outro grupo de desnutridos, que receberam dieta anterior contendo extrato aquoso de café. Todas as dietas experimentais foram oferecidas a partir do nascimento dos filhotes. O número de filhotes por fêmea foi fixado em oito, sendo que posteriormente somente os machos foram mantidos. Os animais tinham livre acesso à água e eram mantidos em sistema claro/ escuro (12/12 h).

Após o desmame, aos 21 dias de vida, os filhotes foram separados, mantendo-se a mesma dieta oferecida para a respectiva fêmea matriz, obtendo-se uma totalidade de seis grupos distintos:

- **(NORM)** grupo normonutrido controle, recebeu ração de biotério para ratos (Labina.) enriquecida com ração para cães (Bonzo);
- **(NCAF)** grupo normonutrido café, foi alimentado com dieta do grupo normonutrido controle acrescida de extrato aquoso de café;
- **(DESN)** grupo desnutrido controle, foi alimentado com dieta correspondente a 60% da ração consumida pelo grupo normonutrido controle;
- **(DCAF)** grupo desnutrido café, recebeu dieta do grupo desnutrido controle acrescida de extrato aquoso de café;
- **(DREC)** grupo desnutrido com condição alimentar reconstituída controle, foi alimentado com dieta correspondente a 60% da ração consumida pelo grupo normonutrido controle e após 60 dias foi alimentado *ad libitum*;
- **(DRECAF)** grupo desnutrido com condição alimentar reconstituída café, recebeu dieta do grupo desnutrido acrescida de extrato aquoso de café; e após 60 dias alimentado *ad libitum*.

Todos os grupos receberam água *ad libitum* e foram pesados semanalmente. Aos 120 dias de vida, os animais foram sacrificados por decapitação e retirado o córtex para o preparo de sinaptossomos.

3.1.3 – PREPARO DA DIETA COM CAFÉ

O preparo da dieta foi por adaptação da técnica utilizada por PAOLINELLI (2002). As rações (Labina® e Bonzo®) foram previamente moídas e misturadas numa proporção de 3:1, respectivamente. A cada 1000 g desta mistura foram adicionados 1000 mL de solução contendo 4% de gelatina em pó, 5% de açúcar e 1% de amido de milho, previamente dissolvidos em água quente, recebendo o nome de dieta controle. A dieta suplementada com café teve como base a dieta controle, porém a essa foi adicionado 1000 mL de extrato aquoso de café (80 g de café torrado para 1000 mL de água a 90 °C). Depois de adequadamente homogeneizada, a massa resultante foi cortada em pequenos pedaços e secada por 12 horas a 60 °C em estufa com circulação forçada de ar (NOVA ÉTICA, modelo 420D, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil).

Composição química da dieta

Tabela 2 - Composição química das dietas (g/100g de ração) *

<i>Nutrientes</i>	<i>Controle</i>	<i>Controle Café</i>
Proteína	23,22	23,39
Carboidrato	45,37	45,79
Lipídeo	4,39	4,51
Teor calórico	313,87 kcal	317,31 kcal

*Os valores são aqueles constantes dos rótulos dos produtos registrados pelo fabricante.

3.1.4 – REAGENTES

Albumina Bovina (Fração V), Reagente de Folin & Ciocalteu (2,0 N), L-ácido glutâmico, HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), β -NADP (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), L-glutamato desidrogenase, foram adquiridos de SIGMA CHEMICAL CO St. Louis, MO, USA. Carbonato de Sódio, Fosfato ácido de potássio e glicose foram adquiridos de MERCK S.A. – Indústrias Químicas, RJ, Brasil. Hidróxido de sódio e Tris base (Tris-(hidroximetil)-aminometano) foram adquiridos

de LABORCLYN – Produtos para Laboratórios LTDA. Tartarato de sódio e potássio foram adquiridos de INLAB S.A.

Os reagentes utilizados nos experimentos são reagentes de grau analítico.

3.1.5 – SOLUÇÕES

Meio de Krebs-Ringer-Hepes

Composição: NaCl 124 mM; KCl 4 mM; MgSO₄ 1,2 mM; HEPES 25 mM; glicose 10 mM. O pH final foi ajustado para 7,4 com NaOH 5 N.

Solução de homogeneização

Composição: sacarose 0,32 M; EDTA 1 mM; ditioneitol 0,25 mM. O pH final foi ajustado para 7,4 com NaOH 0,1 N.

Solução Padrão de Glutamato

0,5 mM de *L-glutamic acid*

3.1.6 EQUIPAMENTOS

Banho com agitação e temperatura regulável, modelo BT-25 YAMATO SCIENTIFIC CO, Japão. Espectrofotômetro modelo SHIMADZU, modelo UV 160 A, Japão. Detector Espectrofluorimétrico Shimadzu RF-551 (Kyoto, Japão). Homogeneizador de tecidos Potter Elvehjem. Centrífuga refrigerada, modelo CR 21 da HITACHI, Japão. Centrífuga Excelsa Baby FANEM modelo 242, Brasil. Estufa com circulação forçada de ar (NOVA ÉTICA, modelo 420D, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil). Bomba peristáltica da INCIBRAS – BP-100, Brasil. Balança digital SARTORIUS BP 2100.

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 - AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO E GANHO DE MASSA CORPORAL

Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais. Diariamente pesava-se a ração administrada e a sobra para avaliação da quantidade de ração ingerida por animal. Tanto para o peso semanal dos animais quanto para o das rações usou-se a balança digital SARTORIUS BP 2100.

3.2.2 - DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLUTAMATO LIBERADO

3.2.2.1 – A OBTENÇÃO DOS SINAPTOSSOMOS

Aos 120 dias de vida, os ratos foram decapitados e os cérebros rapidamente removidos e imersos em um meio de incubação Krebs-Ringer-Hepes (KRH) e mantidos no gelo. Os dois hemisférios cerebrais foram separados sobre papel filtro, umedecidos com meios de incubação, colocados sobre uma placa de Petri invertida no gelo.

Após a dissecação, os córtices cerebrais foram transferidos para um tubo (Thomas Company – B19982) contendo 10,0 mL de solução de homogeneização (sacarose 0,32 M; EDTA 1 mM; ditioneitol 0,25 mM, pH 7,4). Os córtices foram homogeneizados em movimentos “up and down” por 14 vezes no homogeneizador Potter-Elvehjem mantidos no gelo. Este homogeneizado foi centrifugado na centrífuga refrigerada Hitachi (CR21), a 1100 g por 10 min. Em todos os passos da centrifugação foi usada a temperatura de 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante, recolhido com pipeta de Pasteur para uma proveta, teve o seu volume completado para 10,0 mL com a solução anterior (vide item 3.1.5). Com o auxílio de uma bomba peristáltica (Inciras – BP-100) e um fluxo de 2 mL/min, com o objetivo de preservar as interfaces, foram transferidos 2,5 mL do homogenato anterior para outros quatro tubos de centrifuga refrigerada já contendo 8 mL de soluções Percoll (Sigma) distribuídas na ordem decrescente de concentração 23, 15, 10 e 3% (v/v) num volume final de 10,5 mL, e imersos no gelo, segundo DUNKLEY *et al.* (1988). Em seguida foram centrifugados a 39000 g – 15 min e as frações 3 e 4, visíveis de cada tubo, por apresentarem

maior quantidade e mais homogeneidade de estrutura de sinaptossomos foram recolhidas e transferidas para outro tubo e lavadas com cerca de 50,0 mL de meio KRH, seguido de centrifugação a 39000 g – 20 min. Ao término, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão com KRH e transferido para um tubo de 1,2 mL, centrifugado novamente a 2800 g por 20 segundos, em temperatura ambiente para lavagem (Centrifuga Excelsa Baby FANEM modelo 242).

Após novo descarte do sobrenadante, os sinaptossomos foram ressuspensos em um volume de 1200 µL do meio de KRH. Desta suspensão, foram então transferidas alíquotas de 200 µL para 4 tubos contendo 800 µL de KRH em cada um, e 400 µL foi congelado a – 70° C para posterior dosagem de proteínas. Em três destes tubos eram adicionados TiTx-γ numa concentração final de 0,05 µM suficiente para liberar glutamato presente nos sinaptossomos (MASSENSINI, 1996). Os tubos com a suspensão foram mantidos no gelo até o momento da incubação. O protocolo experimental consistiu no seguinte esquema:

Tubo 1 – controle – liberação de glutamato sem estimulação.

Tubo 2, 3 e 4 – Estimulação com toxina TiTx-γ (concentração final 0,05 µM)

Tubo 5 e 6 – Dosagem de proteína

Os tubos, exceto o 5 e 6, ficaram sob agitação por 15 min no banho-maria a 37 °C, (Yamato, Japão – BT – 25). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 11300 g por 10 min em temperatura ambiente e recolhido o sobrenadante em tubos de eppendorf para posterior dosagem de glutamato liberado de vesículas sinápticas do córtex cerebral.

3.2.2.2 – A DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO SINAPTOSSOMAL

A dosagem de proteína seguiu o método de LOWRY *et al* (1951), modificado por HARTREE (1972). Um homogeneizado de sinaptossomos foi preparado na concentração de 1:10. Este homogeneizado foi diluído em água bidestilada na proporção 1:4 em um eppendorf. Retiraram-se 20 µL dessa diluição e foi completado o volume com água destilada para 1,0 mL. Foi adicionado a cada tubo um volume de 0,9 mL da solução A (2,0 g de tartarato de sódio e potássio; 100,0 g de carbonato de sódio e 500,0 mL de solução de 1N NaOH) e aquecido em banho-maria a 50 °C por 10 minutos. Após resfriamento, adicionou-se um volume de 0,1 mL da solução B (2,0 g de tartarato de sódio e potássio; 1,0

g CuSO₄. 5 H₂O e 10,0 mL de NaOH 1N), seguindo-se homogeneização. Após repouso por 10 minutos, na temperatura ambiente, foram adicionados 3,0 mL da solução C (1 volume de Folin-Ciocalteu (~2N) para cada 15 volumes de água destilada) em jatos, seguido de agitação vigorosa. Logo após, incubou-se no banho aquecido (50 °C) por mais 10 minutos. Após resfriamento, foi realizada a leitura das amostras no espectrofotômetro a 650 nm. Para o cálculo de concentração das amostras foi usada uma curva de proteína, utilizando a albumina bovina como padrão.

3.2.2.3 – A LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO

O glutamato liberado foi determinado a 37 °C, por método fluorimétrico, baseado na reação de oxidação do glutamato pela enzima glutamato desidrogenase (GDH), em que o NADP⁺ adicionado ao meio é convertido a NADPH. Este por sua vez, quando excitado a 385nm, emite uma fluorescência que pode ser quantificada e detectada em comprimento de onda de 450nm (KITAYAMA & SUGUMURA, 2001) em um detector espectrofluorimétrico Shimadzu RF-551 (Kyoto, Japão).

Para dosagem das amostras, utilizou-se como referência uma quantificação prévia pelo padrão interno, que correspondia a 5 nmols de glutamato. Este padrão foi previamente preparado (vide item 3.1.5).

Para as leituras da amostra e do padrão foram adicionadas às cubetas as seguintes substâncias, em intervalos de tempo definidos, como pode ser visualizado na tabela 4:

Tabela 3 – Protocolo de leitura de glutamato

Tempo (segundos)	Substância (μL)	Observação
0	1700 de KRH	a 37 °C
0	15,5 de GDH (30 U)	-
0	20 de $\beta\text{-NADP}^+$ (1 mM)	Homogeneizar e zerar fluorímetro
0	200 de amostra	Homogeneizar
180	-	Leitura e registro a 37 °C
180	10 de glutamato como padrão interno	Homogeneizar
360	-	Leitura e registro a 37 °C

Os resultados obtidos na amostra eram quantificados levando em consideração a leitura do padrão interno. De maneira simples, após o registro do padrão interno, possuíamos um valor que correspondia a 5 nmols de glutamato. E após a leitura da amostra, por diferença e uma regra de três simples os resultados eram expressos em nmols de glutamato na amostra por miligrama de proteína.

3.2.3 - A OBTENÇÃO DA TITYUSTOXINA GAMA (TiTX- γ)

Escorpiões *Tityus serrulatus* foram mantidos em caixas plásticas teladas, no escorpionário da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais receberam uma dieta líquida composta de fígado bovino cru, peptona, mistura de sais minerais e vitaminas (REZENDE, 1991). Em ciclos de 25-30 dias coletou-se o veneno através de estímulo elétrico na glândula secretora do animal. Para isso, o escorpião foi imobilizado e levado a um eletrodo onde recebeu o estímulo elétrico. O acúleo foi colocado em contato com a borda de um tubo de ensaio, onde a peçonha foi recolhida e posteriormente liofilizada e armazenada a -20 °C.

Seguindo as técnicas de GOMEZ & DINIZ (1966), modificadas por SAMPAIO *et al.* (1983), fez-se a purificação das frações tóxicas do veneno bruto. Aproximadamente 150 mg do veneno bruto liofilizado foram extraídos duas vezes com água bidestilada, para um

volume final de 5 mL. A cada extração centrifugou-se a amostra por 20 minutos a 15.000 g em centrífuga refrigerada a 4 °C. Os sobrenadantes foram agrupados e aplicados numa coluna de Sephadex G-25-fine. As frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C. Dissolveu-se cerca de 40 mg da segunda fração (T1), obtida na cromatografia do veneno bruto, em 2 mL de solução de bicarbonato de amônio 0,01 M que foi aplicada em uma coluna de troca iônica (CM celulose-52), previamente equilibrada com a mesma solução. Os dois primeiros picos foram eluídos com solução de bicarbonato de amônio 0,01 M e os seis restantes eluídos com um gradiente de concentração de 0,01 a 0,7 M da mesma solução. O oitavo pico corresponde a toxina TiTX- γ . As frações foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C.

3.2.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado teste de normalidade em todas as variáveis estudadas, para a escolha do teste estatístico. Todos os dados seguiram a distribuição normal, portanto, aplicou-se o teste de análise de variância – ANOVA – com distinção das médias pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Para comparação de duas médias usou-se o teste *t* de *Student*. Foi admitido um nível de significância (*p*) inferior a 5%, conferindo ao estudo uma confiabilidade de 95%. Para a análise dos dados foi utilizado o software Sigma Stat 2.03. Os dados foram apresentados como média e erro padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1 – DETERMINAÇÕES DO CONSUMO DE RAÇÃO E DA MASSA CORPORAL

O consumo diário médio de ração dos grupos normonutridos, desnutridos e dos grupos desnutridos com recuperação alimentar está representado na Figura 1. Nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos que ingeriram dieta contendo café quando comparados com os grupos que não receberam a suplementação com café.

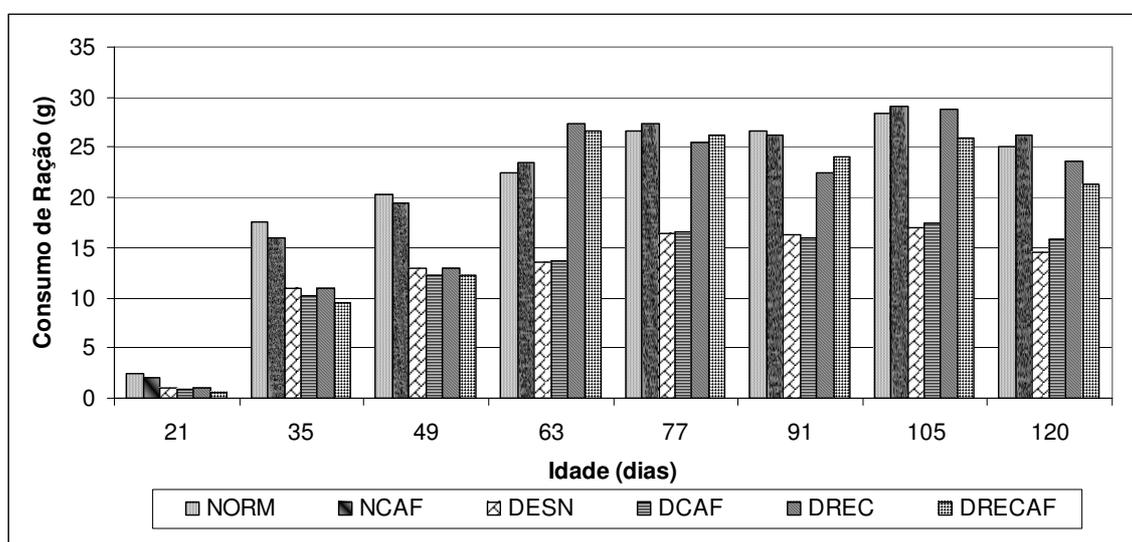


Figura 1 - Consumo médio de ração por grupos de ratos controles e experimentais. NORM representa o grupo normonutrido (controle) que recebeu alimentação *ad libitum*; DESN representa o grupo que recebeu uma dieta correspondente a 60% do consumo médio do grupo controle; NCAF indica o grupo normonutrido que recebeu ração suplementada com café e DCAF, o grupo desnutrido que recebeu 60% do consumo médio do grupo controle com ração suplementada com café. DREC representa o grupo que recebeu uma dieta correspondente a 60% do consumo médio do grupo controle e a partir dos 60 dias recebeu dieta *ad libitum*. DRECAF o grupo desnutrido com recuperação alimentar que recebeu 60% do consumo médio do grupo controle com ração suplementada com café e a partir dos 60 dias recebeu dieta *ad libitum*. O consumo de ração dos grupos desnutridos apresentou-se significativamente menor que dos grupos normonutridos. Nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$ – Teste T de Student) foi observada no consumo de ração entre os grupos suplementados ou não com café.

Da mesma forma que observado no consumo médio diário de ração dos grupos normonutridos, desnutridos e dos grupos desnutridos com recuperação alimentar, os resultados dos efeitos da restrição de alimentos, da ingestão de café e da posterior recuperação alimentar sobre o peso corporal acompanhou uma curva ascendente de acordo

com o tempo de vida e o consumo de alimento. Através desta observação, pode ser comprovado que o modelo de restrição alimentar foi eficiente para determinar um baixo ganho de peso dos animais dos grupos desnutridos, independente da associação do café na dieta proposta.

Na tabela 4 observa-se o efeito da desnutrição e da dieta suplementada com café sobre a massa corporal dos animais aos 120 dias de vida. A restrição protéico-calórica (40%) imposta fez com que os animais desnutridos ao final dos 120 dias apresentassem redução de peso estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparados aos animais da que receberam dieta controle (normonutridos) durante o mesmo período de tempo. Os animais que tiveram a recuperação alimentar aos 60 dias, mesmo aos 120 dias de vida, também apresentaram peso inferior ($p < 0,05$) em relação aos animais normonutridos. Nos grupos controles, com exceção dos normonutridos, os animais não apresentaram diferença significativa nos pesos corporais aos 120 dias de vida entre aqueles que ingeriram café dos que não ingeriram.

Tabela 4 - Peso médio aos 120 dias de vida dos animais normonutridos, desnutridos e desnutridos com recuperação alimentar.

GRUPOS	NORM	NCAF	DESN	DCAF	DREC	DRECAF
MÉDIA	463,5 ^a	429,2 ^b	294,8 ^c	293,3 ^c	397,7 ^d	398,5 ^d
E.P.M.	12,7	11,5	4,9	5,1	9,1	9,2

* NORM representa o grupo normonutrido (controle) que recebeu alimentação *ad libitum*; DESN representa o grupo que recebeu uma dieta correspondente a 60% do consumo médio do grupo controle; NCAF indica o grupo normonutrido que recebeu ração suplementada com café e DCAF, o grupo desnutrido que recebeu 60% do consumo médio do grupo controle com ração suplementada com café. DREC representa o grupo que recebeu uma dieta correspondente a 60% do consumo médio do grupo controle e aos 60 dias recebeu dieta *ad libitum*. DRECAF o grupo desnutrido com recuperação alimentar que recebeu 60% do consumo médio do grupo controle com ração suplementada de café e a partir dos 60 dias recebeu dieta *ad libitum*. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) em animais da mesma idade. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

A figura 2 mostra a evolução do peso corporal dos grupos, desde o dia do nascimento até os 120 dias de vida. Esta figura comprova que efeito da alimentação utilizada influenciou o peso de acordo com a oferta alimentar. Observamos também que a massa corporal dos animais desnutridos e aqueles que tiveram recuperação alimentar após os 60 dias de vida não diferiram até o momento da recuperação alimentar, indiferentemente

da dieta a que estavam expostos. O modelo de restrição de alimentos utilizado no presente estudo não alterou o peso ao nascer.

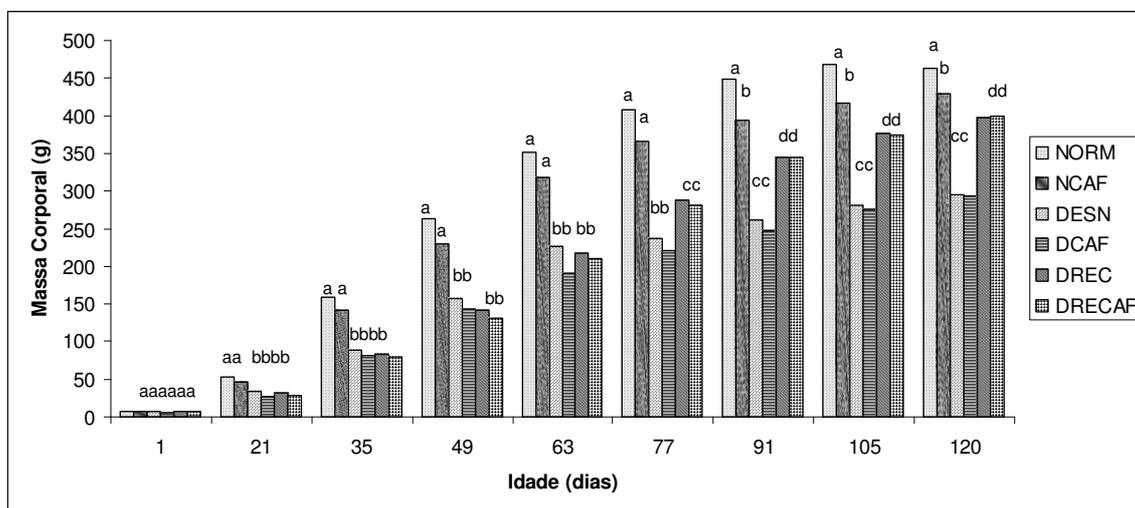


Figura 2 – Evolução do peso corporal dos grupos. NORM representa o grupo normonutrido (controle) que recebeu alimentação *ad libitum*; DESN representa o grupo que recebeu uma dieta correspondente a 60% do consumo médio do grupo controle; NCAF indica o grupo normonutrido que recebeu ração suplementada com café e DCAF, o grupo desnutrido que recebeu 60% do consumo médio do grupo controle com ração suplementada com café. DREC representa o grupo que recebeu uma dieta correspondente a 60% do consumo médio do grupo controle e a partir dos 60 dias recebeu dieta *ad libitum*. E DRECAF o grupo desnutrido com condição alimentar reconstituída que recebeu 60% do consumo médio do grupo controle com ração suplementada com café e a partir dos 60 dias recebeu dieta *ad libitum*. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste T de Student ($p < 0,05$) quando comparado entre os animais da mesma idade

4.2 – CONTEÚDO DE GLUTAMATO LIBERADO DE SINAPTOSSOMOS DO CÓRTEX CEREBRAL DOS RATOS NAS CONDIÇÕES BASAIS E ESTIMULADAS POR TITYUSTOXINA GAMA

Após a decapitação, os córtices foram retirados. Os sinaptossomos foram preparados para a determinação do conteúdo de glutamato liberado. Os valores individuais encontram-se no apêndice A.4.

A quantidade de glutamato (GLU) liberada pelas estruturas analisadas foi expressa em nmol/mg proteína. Foram aferidos em todos a quantidade deste neurotransmissor na condição basal (b) e estimulado (e) por tityustoxina gama $0,05\mu\text{M}$ (TiTX- γ) de

concentração final no centésimo vigésimo dia. A figura 3 mostra o teor de glutamato liberado de sinaptossomos dos grupos normonutridos, desnutridos e desnutridos que tiveram recuperação alimentar, com e sem café.

Observa-se que os valores de liberação, na condição basal, do neurotransmissor glutamato dos sinaptossomos do córtex cerebral de todos os grupos não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$), mesmo em situação na qual os animais passaram por um estresse alimentar.

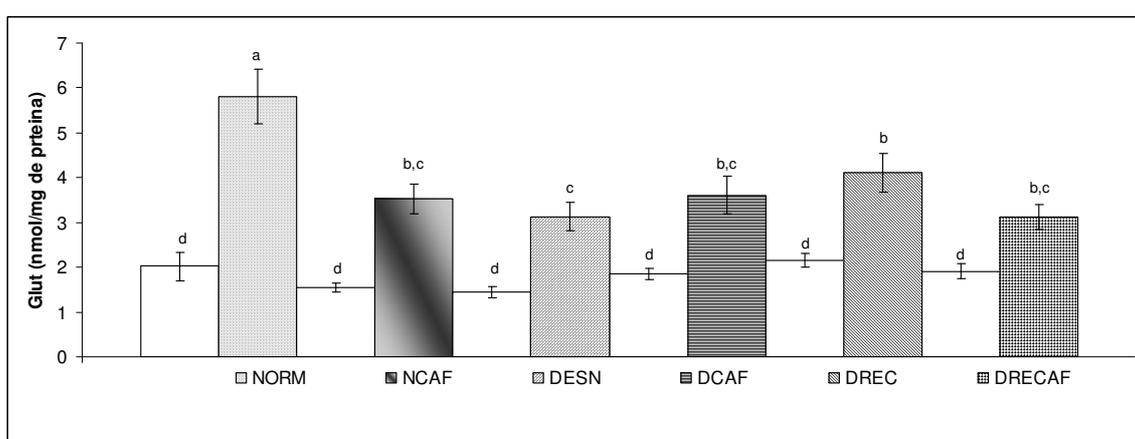


Figura 3 – Efeito da desnutrição, da desnutrição com recuperação alimentar e da dieta suplementada com café sobre o conteúdo de glutamato liberado aos 120 dias de vida. NORM representa o grupo normonutrido (controle) que recebeu alimentação *ad libitum*; DESN representa o grupo que recebeu uma dieta correspondente a 60% do consumo médio do grupo controle; NCAF indica o grupo normonutrido que recebeu ração suplementada com café e DCAF, o grupo desnutrido que recebeu 60% do consumo médio do grupo controle com ração suplementada com café. DREC representa o grupo que recebeu uma dieta correspondente a 60% do consumo médio do grupo controle e a partir dos 60 dias recebeu dieta *ad libitum*. E DRECAF o grupo desnutrido com recuperação alimentar que recebeu 60% do consumo médio do grupo controle com ração suplementada com café e a partir dos 60 dias recebeu dieta *ad libitum*. As colunas em branco representam as condições basais do neurotransmissor. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) em animais da mesma idade. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

Os animais normonutridos apresentam valores de liberação estimulada de glutamato superiores aos demais grupos estudados, inclusive para animais normonutridos que ingeriram café. Este último grupo não diferiu dos demais.

Na figura 4 observamos o efeito da estimulação pela tityustoxina gama nos sinaptossomos, o que representa a diferença entre o GLU liberado por estimulação e o GLU basal. Os resultados apresentados indicam mais nitidamente a maior liberação de GLU em

animais normonutridos controle do que em animais desnutridos ou não ou que ingeriram café.

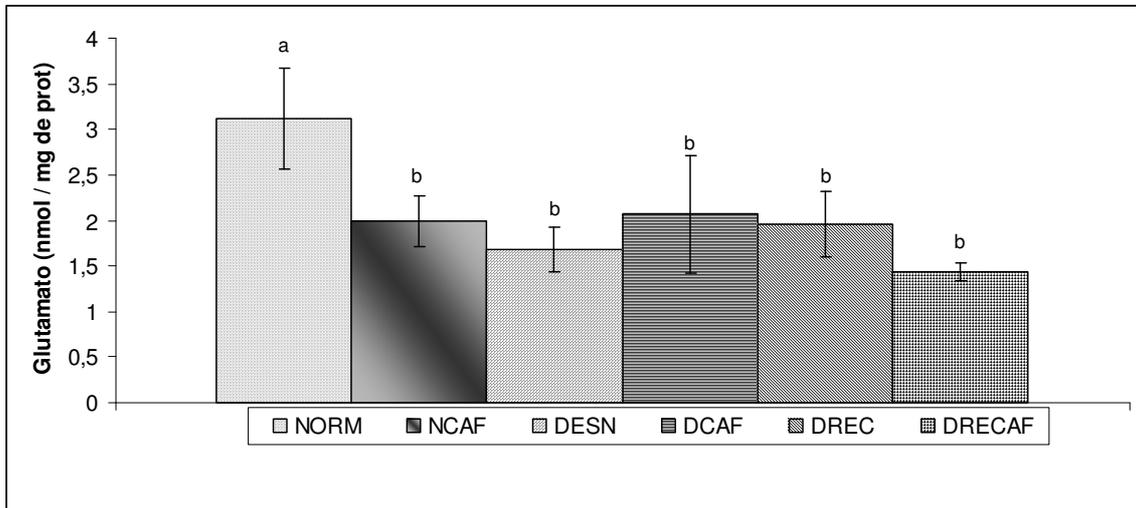


Figura 4 – Conteúdo de glutamato liberado de sinaptossomos de córtex de ratos com 120 dias de vida com estimulação por Tityustoxina gama menos o basal. NORM representa o grupo normonutrido (controle) que recebeu alimentação *ad libitum*; DESN representa o grupo que recebeu uma dieta correspondente a 60% do consumo médio do grupo controle; NCAF indica o grupo normonutrido que recebeu ração suplementada de café e DCAF, o grupo desnutrido que recebeu 60% do consumo médio do grupo controle com ração suplementada com de café. DREC representa o grupo que recebeu uma dieta correspondente a 60% do consumo médio do grupo controle e a partir dos 60 dias recebeu dieta *ad libitum*. E DRECAF o grupo desnutrido com recuperação alimentar que recebeu 60% do consumo médio do grupo controle com ração suplementada com de café e a partir dos 60 dias recebeu dieta *ad libitum*. Os resultados são expressos como média \pm EPM.

5. DISCUSSÃO

Nutrientes são necessários para o crescimento e desenvolvimento dos indivíduos. É bem aceito, hoje em dia, que não é somente para atender as necessidades fisiológicas que os nutrientes devem ser ingeridos em quantidade e proporção adequadas, mas também para proteger os indivíduos contra os efeitos adversos do meio ambiente que, neste caso, eles estão incluídos em alimentos definidos como funcionais (DE ANGELIS, 2001). O café é uma bebida apreciada em todo mundo tanto pelo seu sabor quanto pela sua ação fisiológica a favor da saúde, aceito, portanto, como alimento funcional. O cérebro é, sem dúvida, um

dos órgãos protegidos pela ingestão rotineira do café ou de alguma substância ativa nele contida (COSTA *et al*, 2006).

Assim, o presente estudo associa a alimentação, o café e o sistema nervoso central glutamatérgico, usando ratos da espécie Wistar como ferramenta para observar os efeitos desta combinação. A escolha de ratos para os experimentos foi devido ao fato de serem animais de fácil manuseio e de ciclo reprodutivo curto (NÓBREGA, 1986).

O modelo de restrição alimentar pós-natal do tipo marasmática ocasionou uma diminuição no peso corporal e a reabilitação alimentar após um período de 60 dias de restrição não foi capaz de reverter o efeito da desnutrição, até 120 dias de vida. Isso sugere que o modelo deveria ser efetivo para comprovar alterações neurofisiológicas ocasionadas pela desnutrição. Nossos resultados confirmaram a hipótese, uma vez que liberação aumentada de glutamato, por efeito de estimulação pela tityustoxina gama, foi observada nos ratos desnutridos, apesar de menos intensa do que em animais normonutridos. A menor quantidade do neurotransmissor liberada por estimulação nos ratos desnutridos parece ter sido causada pelas condições adaptativas do cérebro (programing), considerando-se que a desnutrição que produziu esse efeito foi imposta durante o período crítico de crescimento e desenvolvimento fisiológico (FERNANDES *et al*, 2003). Os dados obtidos de liberação de glutamato cálcio-independente vão de encontro a estudos já sacramentados da literatura (NICHOLLS *et al*, 1987 e MASSENSINI *et al*, 1998), onde se observa uma menor liberação quando comparada a liberação na presença deste mineral.

Em condições alimentares adequadas para o desenvolvimento fisiológico, a capacidade de produção de glutamato a ser liberado pelo estímulo da toxina escorpiônica pode ser suficiente para proporcionar condições fisiopatológicas de citotoxicidade, como é conhecido na literatura (MILLAN *et al.*, 1993). Assim, a estimulação pela tityustoxina gama foi capaz de elevar em animais normonutridos a capacidade de liberação *in vitro* do neurotransmissor glutamato confirmando dados da literatura (MASSENSINI *et al*, 1998) e o café foi capaz de reduzir essa liberação, sugerindo uma modulação no sistema glutamatérgico e por conseqüência uma proteção contra possível ação citotóxica por excesso de glutamato. Segundo dados da literatura, outros neurotransmissores têm liberação aumentada por ação de toxinas de escorpião (ESPINDOLA, 1983), portanto o efeito da elevação de glutamato na fenda sináptica, em consonância com outros neurotransmissores,

não descarta a possibilidade de citotoxicidade. O efeito modulador do café em animais normalmente alimentados assemelha-se ao efeito do “programing” ocasionado pela desnutrição protéico-calórica, observado no presente estudo, uma vez que a toxina foi capaz de aumentar a liberação de glutamato no terminal nervoso, mas não foi afetada pela ingestão de café. O fenômeno poderia ser explicado pelo fato de que o efeito adaptativo do “programing”, devido às condições de deficiências nutricionais no período de desenvolvimento cortical, suplanta o efeito modulador da ingestão do café que é também efeito adaptativo. Da mesma maneira, não se pode descartar o possível efeito citotóxico do glutamato no animal desnutrido, apesar de os dados sugerirem que tanto a desnutrição quanto a ingestão de café mantêm a homeostase com nível de concentração de neurotransmissores mais elevados.

O modelo de restrição adotado permite extrapolações para o ser humano, considerando a semelhança com o que ocorre em crianças desnutridas na infância e que podem ser nutricionalmente reabilitadas após o período crítico de crescimento e desenvolvimento humano (DOBBING & SANDS, 1979).

A presença do café incluído na dieta não alterou a ingestão da ração quando comparada ao grupo semelhante sem café. A partir dos 90 dias de vida o peso dos animais normonutridos foi semelhante ao daqueles que ingeriram café, permanecendo até o sacrifício. É possível que à semelhança da desnutrição, a observação se deva a um aumento do metabolismo basal (YOUNG *et al.*, 1985). Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que não há motivos para restrição de uso do café quando se depara com a evolução ponderal, corroborando dados sobre costumes de ingestão de café pós-desmame por crianças na Guatemala (ENGLE *et al.*, 1999).

6. CONCLUSÃO

A desnutrição neonatal diminuiu a liberação de glutamato no terminal nervoso, evidenciada pela estimulação com a toxina escorpiônica, provavelmente devido ao efeito adaptativo resultante do “programing”, ocasionado pela desnutrição no período crítico de crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso central. A ingestão de café promoveu o efeito semelhante, provavelmente por uma adaptação resultante em neuroproteção, diminuindo a capacidade de liberação de glutamato no terminal nervoso do cérebro, quando submetido a estresse, no caso, estimulação por tityustoxina- γ .

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, R.V. O Sistema de Biotransformação Hepático, Induzido pela Desnutrição e pelo Paracetamol, é Modulado Pela Ingestão de Café. Belo Horizonte: Faculdade de Farmacia da UFMG. 2005, 45p. (Dissertação, mestrado em Ciências de Alimento).
- ALMEIDA, S.S.; SOARES, E.G.; BICHUETTE, M.Z; GRAEF, F.G.; De OLIVEIRA, L.M. Effects of early posnatal malnutrition and chlordiazepoxide on experimental aversive situation. *Physiol. Behav.*, v.51, p.1195-1199, 1992.
- AMARAL, S.; FONTANA, A. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* 41: 313-318, 2002.
- ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro.* v.3, n.2, p. 145-154, 2004.
- ANDERSON, C.M; SWANSOS, R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions. *Glia.*, v.32, p.1-14, 2000.
- ASCHERIO A.; ZHANG, S.M.; HERNAN, M.A.; KAWACHI, I.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C. A prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Ann Neurol*, v.32, p.78-85, 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>> Acesso em: 01 de setembro de 2004.
- BALLABRIGA, A. Some aspects of clinical and biochemical changes related to nutrition during brain development in humans. In: Evrard P., Minkowski A. Developmental neurobiology. New York, p.271-286, 1989.
- BATISTA FILHO M. Alimentação, Nutrição e Saúde. In: Rouquayrol MZ, Almeida NF. Epidemiologia e saúde. Rio de Janeiro: Medsi, p.353-373, 1999.
- BEDI, K.S.; THOMAS, Y.M.; DAVIS, C.A.; DOBBING, J. Synapse to neuron ratios of the frontal and cerebellar cortex of 30-day-old and adult rats undernourished during early postnatal life. *J.Comp.Neurol.*, v.193, p.49-56, 1980.
- BENEDETTI, M.D.; BOWE, J.H.; MARAGANORE, D.M.; MCDONNELL, S.K.; PETERSON, B.J.; AHLKOG, J.E.; SCHAID, D.J.; ROCCA, W.A. Smoking, alcohol, and coffee consumption preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Neurology*, v.55, p.1350-1357, 2000.

- BRANDAO, F. B.; Delirium: um estudo comparativo entre adultos jovens, adultos e idosos. Campinas: Faculdade de Educação da UNICAMP. 2000, p.120 (Dissertação de mestrado).
- BUGGY, D.J.; NICOL, B.; ROWBOTHAM, D.J.; LAMBERT, D.G. Effects of intravenous anesthetic agent on glutamate release: A role for GABA_A receptor-mediated inhibition. *Anesthesiology*, v.92, p.1067-1073, 2000.
- CAROBREZ, A. P. Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. *Rev Bras Psiquiatr.* v.25(Supl II), P.52-82, 003.
- CARVALHO R., F.; TOLEDO DE O., T.; NAGEM, T. J. Efeitos de Naringenina e Bixina Associados com Leite de Cabra Sobre o Metabolismo Lipídico de Coelho. *Rev. chil. nutr.*, vol.31 supl.1, p.177-182, 2004.
- CASTIGLIA, P. T. Protein-energy malnutrition (Kwashiorkor and marasmus). *J Pediatr Health Care*, 10: 28-30, 1996.
- CHAPMAN, A. Glutamate and epilepsy. *J. Nutr.* v.130, p.1043S-1045S, 2000.
- CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) Coffee: chemistry. 2. ed. New York: Elsevier, p.305 1989,
- CONTI, F.; MINELLI, A.; DEBIASE, S.; MELONE, M. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Mol. Neurobiol.* v.14, p.1-18, 1997.
- COSTA, M.S.; GHISLENI, G.; SOUZA, D.O.; PORCIUNCULA, L.O.; Tratamento com cafeína altera a captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos. In: FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 03.099, 2006, Porto Alegre. Resumos: FESBE, 2006.
- COTMAN, C.W.; KAHLE, J.S.; MILLER, S.E.; ULAS, J.; BRIDGES, R.J. Excitatory amino acid neurotransmission. *Psychopharmacol.* v.7, p.75-85, 1995.
- DAIKHIN, Y.; YUDKOFF, M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J. Nutr.* v.130, p.1026S-1031S, 2000.
- DE ANGELIS, R. C. Novos Conceitos em Nutrição. Reflexões a respeito dos elos dieta e saúde. *Arq Gastroenterol*,v.38, p.269-271, 2001.
- DE ROBERTIS E., DE IRALDI A.P., ARNAIZ G.R. AND SALGANICOFF L. Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain. I. Isolation and subcellular distribution of acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* V.9, p.23-35, 1962.

- DINGLEDINE, R.; McBAIN, C.J. Excitatory aminoacid transmitters. In: SIEGEL, G.J. et al. (Ed.) *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, 5ed. New York: Raven Press, 1994.
- DOBBING, J.; SANDS, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Dev.*, v.3, p.79-83, 1979.
- DRUMOND, Y.A., COUTO, A.S., MORAES-SANTOS, T., ALMEIDA, A.P., AND FREIRE-MAIA, L. Effects of toxin Ts- γ and tityustoxin purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom on isolated rat atria. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.111C(2),p.183-190, 1995.
- DUNKLEY, P.R.; HAETH, J.W.; HARISSON, S.M.; JARVIE, P.E.; GLENFIELD, P.J.; ROSTAS, J.A.P. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S₁ fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Research.*, v.441, p.59-71, 1988.
- DYSON, S.E.; JONES, D.G. Some effects of undernutrition on synaptic development - a quantitative ultrastructural study. *Brain Res.*, v.114, p.356-378, 1976.
- EDMONDS, B.; GIBB, A.J; COLQUHOUN, D. Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. *Annu. Rev. Physiol.* v.57, p. 495-519, 1995.
- ENGLE, P.L.; VASDIAS, T.; HOWARD, I.; ROMERO-ABAL, M.E.; QUAN DE SERRANO, J.; BULUX, J.; SOLOMONS, N.W.; DEWEY, K.G. Effects of discontinuing coffee intake on iron deficient Guatemalan toddlers cognitive development and sleep. *Erly Human Development.*, v.53, p. 251-269, 1999.
- ERECINSKA, M.; SILVER, I.A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progress Neurobiol.* v.35, p.245-296, 1990.
- ESPINDOLA, F.S. Desnutrição protéico-calórica neonatal em ratos; Influência na liberação e produção de acetilcolina no córtex cerebral, sob a ação in vitro da tityustoxina. 1983. (Dissertação de mestrado) - Departamento de Bioquímica e Imunologia – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1983
- FERNANDES M.T., SESSO R., MARTINS P.A. & SAWAYA A.L. Increased blood pressure in adolescents of low socioeconomic status with short stature. *Pediatr.Nephrol.* v.18, p.435-439, 2003.

- FERRÉ S.K., et al. Adenosine - dopamine interactions in the brain. *Neuroscience*, v.51, p.501-12, 1992.
- FIACCO T. A., ROSENE D. L., GALLER J. R. AND BLATT G. J. Increased density of hippocampal kainate receptors but normal density of NMDA and AMPA receptors in a rat model of prenatal protein malnutrition. *J. Comp. Neurol.* v.456, p.350–360, 2003
- FREDHOLM, B.B. Adenosine, adenosine receptors and actions of caffeine. *Pharmacology & Toxicology.* v.76, p.93-101, 1995.
- FREDHLOM, B.B., SOLLEVI, A. On the mechanism of action of theophylline and caffeine. *Acta Medica Scand.* v.217, p. 149-153, 1999.
- FULLER G. N., WIGGINS, R.C. Differential growth recovery with-in the brains of postnatally undernourished rats. *Dev Brain Res*, v.15, p. 280-284, 1984.
- GALLO, V.; GHIANI, C.A. Glutamate receptors in glia: new inputs and new functions. *Trends Pharmacol. Sci.* v.21, p.252-258, 2000.
- GOMES, G.B. Efeito do café sobre o sistema de biotransformação hepático de ratos durante o crescimento e desenvolvimento Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2004. (Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos).
- GOMEZ, M.V.; DINIZ, C.R. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Mem. Inst. Butantan*, v.33, p.899-902, 1966.
- GONÇALVES, L.A.; Efeito da restrição alimentar e do envelhecimento sobre o sistema colinérgico cortical de ratos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2001. 84p. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- GRAY E.G. AND WHITTAKER V.P. The isolation of nerve endings from brain: an electron microscopic study of cell fragments derived from homogenization and centrifugation. *J. Anat. (Lond.)* v.96, p.79-88, 1962.
- GUYTON, A.C. *Tratado de Fisiologia Médica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.125, 1992.
- HANDLEY, O. J. Treatment Farmacológico, Cellular and Genetic of the Illness Of Huntington. *Clinical Science*, v.110, p.73-78, 2006.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, v.48, p.422–427, 1972.

- HAZIN, A. N. Mielinização do encéfalo em crianças com desnutrição grave. Recife: Instituto materno-infantil prof. Fernando Figueira. 2006, 05p. (Dissertação, Mestrado em saúde materno-infantil).
- HELFENSTEIN JR. M.; HEYMANN, R.; FELDMAN. Prevalence of Irritable Bowel Syndrome in Patients with Fibromyalgia. *Rev Bras Reumatol*, v. 46, n. 1, p. 16-23, 2006
- INTERNATION COFFEE ORAGANIZATION. The story of coffe coffee. Disponível em: <<http://www.ico.org>> Acesso em: 01 de setembro de 2004.
- KAWAI, S.; NAKAMURA, H.; MATSUO, T. Effects of early postnatal undernutrition on brainstem auditory potentials in weaning rats. *Biol. Neonate.*, v.55, p.268-274, 1989.
- KELLER, E.A., MUNARO, N.I. and ORSINGHER, O.A. "Perinatal undernutrition reduces alpha and beta adrenergic receptor binding in adult rat brain", *Science* v.215, p.1269–1270, 1982.
- KITAYAMA, S.; SUGIMURA, M. Effects of volatile and intravenous anesthetics on the uptake of GABA, glutamate and dopamine by their transporters heterologously expressed in COS cells and in rat brain synaptosomes. *Toxicology Letters*, v.123, p.69-76, 2001.
- KUFLER SW; NICHOLLS JG & MARTIN AR. *From neuron to brain*, 2nd. ed. Sinauer Associates, Massachusetts, 1984.
- KAWAI, S.; NAKAMURA, H.; MATSUO, T. Effects of early postnatal undernutrition on brainstem auditory potentials in weaning rats. *Biol. Neonate.*, v.55, p.268-274, 1989.
- LAZDUSNKI, M., FRELIN, C., BARHANIN, J., LOMBET, A., MEIR, H., PAURON, D., ROMEY, G., SCHIMID, A., SCHWEITZ, H., VIGNE, P. AND VIJVERBERG, H.P.M. Polypeptide toxins as tools to study voltage sensitive Na⁺ channels. *Annals New York Academy of Sciences*, v.479, p.204-220, 1986.
- LAJTHA, A.; DUNLOP, D.; PATLAK, C.; TOTH, J. Compartments of protein metabolism in developing brain. *Biochimica et Biophysica Acta*.v.561, p.491-501, 1979.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.
- MAGISTRETTI, P.J. ; PELERIN, L.; ROTHMANN, D.L.; SCHULMAN, R.G. Energy on demand. *Science* v.283, p.496-497, 1999.

- MASSENSINI, A.R; Estudo comparativo dos efeitos da Tityustoxina e da Toxina-gama sobre o sistema nervoso central de ratos. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 1996, 47p. (Dissertação, mestrado em Ciências Biológicas).
- MASSENSINI, A. R. ; SANTOS, T. M. e ; GOMEZ, M. V. ; ROMANO-SILVA, M. A. . Alpha and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on[Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i.. *Neuropharmacology, Oxford*, v. 37, n. 3, p. 289-297, 1998.
- MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology. *J. Nutr.* v.130, p.1007S-10015S, 2000.
- MILLAN, M.H.; CHAPMAN, A.G.; MELDRUM, B.S. Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Res.* v.14, p.139-148, 1993.
- MODY, I.; MACDONALD, J.F. NMDA receptor-dependent excitatory: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol. Sci.* v.16, p.356-359, 1995.
- MORAES-SANTOS, T. Dietary effects in vitro rat neuronal protein synthesis during growth and development. *Brain Res. Bull.* v.7, p.385-389, 1981.
- MORGAN, B.L.G.; WINICK, M. Pathological effects of malnutrition on the Central Nervous System. In: SIDRANSKY, H. (Ed.) *Nutritional pathology; pathobiochemistry of dietary imbalances*. New York: Marcel Dekker. P.400, 1985.
- MORGANE, P.; MILLER, M.; STERN, W.; HALL, R.; BRONZINO, J.; KISSANE, J.; HAWRELEWICZ, E; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition and the developing central nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.2: p.137-230, 1978.
- NAITO, S.; UEDA, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* v.44, p.99-109, 1985.
- NEHLIG, A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and Animal data. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 23, p.563-576, 1999.
- NICHOLLS, D. G.; The glutaminergic nerve terminal. *Eur J Biochem* v. 212, p.613–631,1993.

- NICHOLLS, D.G., SIHRA, T.S., SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.* v.49, p.50-57, 1987.
- NÓBREGA F.J. T.S.S.Q.&T.C.E.P. Repercuições da desnutrição protéico calórica no sistema nervoso central. *In Panamed Ed. Anonymouspp.* p.325-339, 1986.
- NUNES, M.L; BATISTA, B.B; MICHELI, F.; BATISTELLA, V. Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats. *J. Pediatr.*, v.78, p.39-44, 2002
- OLIVEIRA, A.L.G. Efeito da restrição alimentar e do envelhecimento sobre o sistema nervoso central glutamatérgico e o compartimento fagocítico do sistema imune: um modelo experimental para o estudo da nutrição de idosos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 1998. 97p. (Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos).
- ONIS M., FRONGILLO E.A., BLUSSNER M. Is malnutrition declining ? An analysis of changes in levels of child malnutrition since 1980. *Bulletin of the World Health Organization.*; v.78, p.1222-1233, 2000.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUKUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, v.54, p.581-618, 1998.
- PALUSKA SA. Caffeine and exercise. *In Curr Sports Med Rep.* Aug; 213-219. 2003
- PAOLINELLI, S. T. Ação da cúrcuma com alimento funcional sobre o sistema de biotransformação de xenobióticos induzidos pela desnutrição. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2002, 73p. (Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos).
- PAPADELIS, C.; KOURTIDOU-PAPADELI, C.; VLACHOGIANNIS, E.; SKEPASTIANOS, P.; BAMIDIS, P.; MAGLAVERAS, N.; PAPPAS, K. Effects of mental workload and caffeine on catecholamines and blood pressure compared to performance variations. *Brain and Cogn.*, vol.51, p.143-154, 2003.
- PEDROSA, M.L.; MORAES-SANTOS, T. Neuronal protein biosynthesis by neonatally malnourished and nutritionally recovered rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*v.20, p.331-338, 1987.
- PICANCO-DINIZ, C.W., ARAUJO, M.S., BORBA, J.M.C., GUEDES, R.C.A. NADPH-Diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual

- cortex of adult rats malnourished during development. *Nutr.Neurosc.* v.1, p. 35-48, 1998.
- PLANTZ, G.R.; WILLISTON, J.S.; JEWETT, D.L. Effects of undernutrition on development of far-field auditory brain stem response in rat pups. *Brain Res.*, v.213: p.319-326, 1981.
- POLLI LOPES AC; CASALETTO ROSA L; BELEBONI RO; PEREIRA RNR; VASCONCELOS CAC & MOREIRA JE. Molecular aspects of synaptic Transmission. *Medicina, Ribeirão Preto*, 32: 167-188, 1999.
- POSSANI, L. D., MARTIN, B. M., MOCHA-MORALES, J., SVEDENSEN, I. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Calsbeg Res. Commun.* V.46, p. 195-205, 1981.
- REIS, H. J. Inibição da Liberação exocitótica e citoplasmática de Glutamato pela toxina Tx3-3, do veneno de *Phoneutria nigriventer*, em sinaptosomas de hipocampo de ratos. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 1998. (Dissertação, mestrado Ciências Biológicas).
- REZENDE, G.H.S. Neuroplasticidade induzida pelo *Status Epilepticus* em ratos normonutridos e desnutridos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2006 (Dissertação, mestrado em Ciências de Alimentos).
- REZENDE, M.B. Efeito da desnutrição pós-natal na resposta colinérgica estimulada in vivo por tityustoxina gama do escorpião *Tityus serrulatus*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 1991 (Dissertação, mestrado em Bioquímica).
- ROMANO-SILVA, M.A; RIBEIRO-SANTOS, R.; RIBEIRO, A.M; GOMEZ, M.V.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.J. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca^{+2} entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin Ph TX2 and potassium depolarization. *Biochem. J.* v.296, p.313-319, 1994.
- ROSS, G.W.; ABBOTT, R.D.; PETROVITCH, H.; MORENS, D.M.; GRANDINETTI, A.; TUNG, K.H.; TANNER, C.M.; MASAKI, K.H.; BLANCHETTE, P.L.; CURB, J.D.; POPPER, J.S.; WHITE, L. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *JAMA*, v.283, p.2674 –2679, 2000.

- RYAN, L.; HATFIELD, C.; HOFSTTER, M. Caffeine reduces time-of-day effects on memory performance in older adults. *Am. Psychol. Soc*, v.13, n. 1, p., 2002.
- SALGADO, A. H. I. Mecanismos de liberação de ATP em sinaptosomas de córtex de ratos. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 1996 (Tese, Doutor em Ciências).
- SALDAÑA, M.D.A., MAZZAFERA, P., MOHAMED, R.S. Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com c supercrítico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v. 17 n. 4 Campinas Dez. 1997.
- SAMPAIO, S.V.; LAURE, C.J.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon.*, v.21, p.265-277, 1983.
- SANCHEZ-PRIETO, J.; SIHRA, T.S. NICHOLLS, D.G. Characterization of the excitotoxic release of glutamate from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. *J. Neurochem.* v.49, p.58-64, 1987.
- SANTOS-MONTEIRO, J.; GUEDES, R. C. A.; CASTRO, R. M.; FILHO, J. E. C. Psychosocial stimulation and brain plasticity in malnourished individuals. *Rev. Bras. Saude matern. infant.*, v. 2(1), p. 15-22, 2002.
- SANTOS, R.C.; MORAES-SANTOS, T. Effect of neonatal malnutrition on leucine renewal and protein biosynthesis in neurons of rats. *Brain Res. Bull.* v.4, p.207-211, 1979.
- SELF D.W. Opposite modulation of cocaine-seeking behavior by D1 and D2 - like dopamine receptor agonists. *Science.* v.271, p.1586-9, 1996.
- SCHOUSBOE, A.; HERTZ, L., DRINGEN, R.; SCHOUSBOE, A., R. ROBINSONR. S. Astrocytes: Glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research*, v.57, p.417-428, 1999.
- SILVA, M.F.R.; PEIXOTO, P.M.V.; SANTOS, A.A.D.; ESPINDOLA, F.S. Isolation of an enriched fraction of synaptosomes from *Apis mellifera* brain using a discontinuous percoll gradient and identification of myosins V and VI. *J. Biosc.* v.20, p.153-161, 2004.

- SMITH, A.; BRICE, C.; NASH, J.; RICH, N.; NUTT, D.J. Caffeine and central noradrenaline: effects on mood, cognitive performance, eye movements and cardiovascular function. *J. Psychopharm.*, vol.17, p.283-292, 2003.
- SOARES, A.I.S.M., FONSECA, B.M.R. A cafeína é uma das substâncias mais estudadas, será que realmente a conhece? *Toxicologia e Análises Toxicológicas*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. 2004/05.
- SCHWARZSCHILD, M.A.; XU, K.; OZTAS, E.; PETZER, J.P; CASTAGNOLI, K.; CASTAGNOLI, N.; CHEN, J. Neuroprotection by caffeine and more specific A2a receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *Neurobiology*.v.61, p.s55-s61, 2003.
- TILLAKARATINE, N.J.; MEDINA-KAUWE, L.; GIBSON, K.M. Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in neuroal and non-neuronal tissues. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol*.v.112, p.247-263, 1995.
- VESCE, S.; BEZZI, P.; VOLTERRA, A. the highly integrate dialogue between neurons and astrocytes in brain function. *Sci. Prog.* v.82, p.251-270, 1999.
- VITORINO, M. D.; FRANÇA, A.S.; OLIVEIRA, L.S; BORGES, M.L.A. Metodologia de obtenção de extrato de café visando a sosagem de compostos não voláteis. *Revista Brasileira de Armazenamento*. V. Especial café, n.3, p.17-24, 2001.
- YAMATO, T.; YAMASAKI, S.; MISUMI, Y.; KINO, M.;OBATA, T.; AOMINE, M.; Modulation of the stress response by coffee: an in vivo microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat. *Neuroscience letters*. v.332, p.87-90, 2002.
- YANAGIMOTO, K.; OCHI, H.; LEE, K.; SHIBAMOTO.; Antioxidative Activities of Fractions Obtained from Brewed Coffe. *J. Agric. Food. Chem.* v.52, p. 592-596, 2004.
- WAITZBERG, D. L. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3.ed. São Paulo: Atheneu.V.1, 2000.
- WATERLOW JC. Protein energy malnutrition: general introduction. In: _____. Protein Energy Malnutrition. London: Edward Arnold, p. 1-13, 1992.
- WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORE, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci*.v.11, p.25-33, 1990.

WHO (World Health Organization), Administrative Committee on Coordination (ACC), Standing Committee on Nutrition (SCN). Nutrition through life, 4th report on the world nutrition situation. Geneva: ACC/SCN/WHO; 2000. WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages, *J. Nutr.* v.89, p.300-306, 1966.

8-APÊNDICE A

Tabela A.1 - Consumo de ração dos animais normonutridos, desnutridos e desnutridos recuperados.

DIAS/GRUPOS	NORM	NCAF	DESN	DCAF	DREC	<i>DRECAF</i>
21	2,45	1,95	1,00	0,80	1,00	0,60
35	17,62	16,00	10,89	10,20	10,90	9,50
49	20,37	19,39	13,00	12,20	13,00	12,20
63	22,51	23,50	13,50	13,70	27,32	26,67
77	26,69	27,31	16,40	16,50	25,44	26,27
91	26,63	26,20	16,30	16,00	22,53	24,04
105	28,32	29,11	17,00	17,50	28,84	25,98
120	25,00	26,20	14,60	15,80	23,64	21,37
MÉDIA	21,20	21,21	12,84	12,84	19,08	18,33
DESVIO	2,96	3,15	1,84	1,92	3,45	3,44
E.P.M.	7,01	7,45	4,35	4,55	8,16	8,13

Tabela A.2 - Peso aos 120 dias de vida dos animais normonutridos, desnutridos e desnutridos recuperados.

GRUPOS	NORM	NCAF	DESN	DCAF	DREC	<i>DRECAF</i>
	480	420	313	288	380	368
	492	390	313	279	382	442
Peso	456	469	322	323	371	398
aos	500	396	280	288	425	374
120	363	431	279	275	344	391
dias	494	482	290	292	416	362
(g)	467	430	285	277	413	392
	446	481	284	315	423	451
	451	398	296	291	390	405
	486	395	286	305	433	402
MÉDIA	463,5	429,2	294,8	293,3	397,7	398,5
DESVIO	40,1	36,4	15,6	16,2	28,7	29,2
E.P.M.	12,7	11,5	4,9	5,1	9,1	9,2

Tabela A.3 - Evolução do peso corporal dos animais normonutridos, desnutridos e desnutridos recuperados.

DIAS/GRUPOS	NORM	NCAF	DESN	DCAF	DREC	<i>DRECAF</i>
1	6,90	6,30	6,30	4,60	6,30	6,30
21	52,20	46,30	33,80	27,30	31,40	29,00

35	158,90	141,90	89,10	80,90	83,50	80,20
49	264,10	2290	156,90	1430	141,70	130,40
63	351,30	318,40	225,40	191,60	216,70	210,10
77	408,80	366,50	237,10	220,60	288,40	281,10
91	448,30	394,50	260,80	247,00	345,40	345,40
105	467,70	416,90	281,10	276,20	377,10	374,80
120	463,50	429,20	294,80	293,30	397,70	398,50

Tabela A.4 - Conteúdo de glutamato liberado de sinaptossomos de córtex de ratos com 120 dias de vida: em estágio estimulado por Tityustoxina gama menos estágio basal.

GRUPOS	NORM	NCAF	DESN	DCAF	DREC	<i>DRECAF</i>
Glutamato (nmol por mg de prot)	5,31	2,70	1,74	1,72	1,74	1,60
	2,69	1,56	0,91	1,19	0,91	1,48
	1,31	3,34	1,87	1,40	1,87	1,52
	2,10	3,57	3,55	5,17	3,55	1,14
	1,45	1,60	2,16	0,84	2,16	
	1,45	1,57	1,50	2,08	1,50	
	3,24	1,73		2,08		
		1,73		1,72		
		2,70		1,19		
		1,56		1,40		
MÉDIA	3,114397	1,989581	1,686565	2,068638	1,955635	1,437088
DESVIO	1,474812	0,880002	0,605756	1,577036	0,889346	0,203528
E.P.M.	0,557427	0,278281	0,247299	0,643822	0,363074	0,101764