

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO

**EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE GLICOSE GLUT3
E ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM
CÉREBRO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À
DESNUTRIÇÃO NO INÍCIO DA VIDA**

VIVIAN SARMENTO DE VASCONCELOS

MACEIÓ

2009

VIVIAN SARMENTO DE VASCONCELOS

**EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE GLICOSE GLUT3
E ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM
CÉREBRO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À
DESNUTRIÇÃO NO INÍCIO DA VIDA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Ximenes da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

MACEIÓ

2009

Dedicado especialmente aos meus pais, por tudo que me proporcionaram; ao meu marido e companheiro, Graciliano; aos meus filhos amados.

AGRADECIMENTOS

À prof^a Adriana Ximenes pela orientação, prontidão no esclarecimento de dúvidas e dedicação a execução deste trabalho.

Ao prof^o Rubem Guedes e a prof^a Sônia Machado pela colaboração técnico-científica.

Aos docentes do curso de Mestrado em Nutrição da FANUT/UFAL, em especial a prof^a Suzana Lima e a prof^a Terezinha Ataíde pela valiosa participação em mais uma etapa da minha vida acadêmica.

À amiga Roseane (Rose) pelo apoio e companheirismo nos longos dias de dosagem enzimática.

Aos estagiários do Laboratório de Eletrofisiologia: Bruno Bandeira, Michele Tenório e Patrícia Fortes, pela coleta de dados e manutenção dos animais.

Aos técnicos do Biotério Central da UFAL pela manutenção dos animais no período de amamentação.

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho

RESUMO GERAL

A desnutrição energético-protéica consiste em um dos problemas nutricionais mais graves que ocorrem em países em desenvolvimento. A deficiência energética e nutricional no início da vida pode ocasionar importantes alterações nas diferentes fases de desenvolvimento do sistema nervoso central, uma vez que os processos de hiperplasia, hipertrofia e mielinização ocorrem de forma mais intensa. O cérebro utiliza a glicose como seu principal substrato energético. No entanto, em certas condições fisiológicas, como durante a fase de amamentação ou durante o jejum prolongado, as células podem utilizar outros substratos a fim de suprir suas necessidades metabólicas. O transporte de glicose para as células nervosas requer a presença de proteínas transportadoras específicas denominadas GLUTs (*glucose transporters*) que efetuam o transporte de glicose através de difusão facilitada. Além dos transportadores de glicose, proteínas transportadoras de monocarboxilatos (MCTs) são responsáveis pelo influxo neuronal de lactato, sendo o MCT1 o principal responsável pelo fornecimento energético aos neurônios durante o processo de maturação do tecido nervoso. A acetilcolina é um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso, sendo associada com a manutenção de processos de atenção, aprendizagem e memória. Na fenda sináptica a acetilcolina é degradada por enzimas colinesterásicas, a acetilcolinesterase (AChE) e a Butirilcolinesterase (BuChE). O aumento da atividade de frações da AChE vem sendo associada com estados de demência em pacientes idosos e com a perda da função cognitiva em pacientes com Doença de Alzheimer. O presente trabalho se propôs a estudar a expressão do transportador neuronal de glicose GLUT3 e a atividade da AChE no cérebro de ratos adultos jovens (84 dias de vida) que foram amamentados em ninhadas formadas por 6 (grupo controle) ou 12 filhotes (grupo desnutrido). Os resultados demonstraram que o peso dos cérebros dos ratos desnutridos foi significativamente menor ($P < 0,001$, teste t de Student) comparado ao grupo controle. Os níveis glicêmicos e a expressão do GLUT3 nas membranas corticais totais foram também diminuídos pela desnutrição ($P < 0,001$, teste t de Student). A atividade da AChE nos diferentes homogenados do cérebro mostrou uma interação significativa ($P = 0,019$, ANOVA *two-way*, Tukey teste) entre o estado

nutricional e o tipo de fração do homogenado, apresentando uma redução significativa ($p < 0,05$) na atividade desta enzima do homogenado de células em animais controle . Esses resultados mostram pela primeira vez que a desnutrição durante o período de amamentação diminui a expressão do GLUT3 e que o aumento da atividade da acetilcolinesterase associado com a diminuição da expressão do principal transportador de glicose para o cérebro poderia contribuir para déficits cognitivos e alterações da atividade metabólica cerebral.

Palavras – Chave: desnutrição, metabolismo cerebral, transportadores de glicose, acetilcolinesterase

GENERAL ABSTRACT

The protein-energy malnutrition is one of the most serious nutritional problems that occur in developing countries. The energy and nutritional deficiency in early life can cause significant changes in different stages of development of central nervous system, since the cases of hyperplasia, hypertrophy and myelinization occur in more intense. The brain uses glucose as its main energy substrate. However, under certain physiological conditions, as during the weaning or during prolonged fasting, the cells may use other substrates in order to meet their metabolic needs. The transport of glucose to the nerve cells requires the presence of specific transporter proteins called GLUT's (Glucose Transporters) to perform the transport of glucose by facilitated diffusion. Besides the transporters of glucose, transporter proteins of monocarboxylates (MCTs) are responsible for neuronal influx of lactate, MCT1 being the main responsible for providing energy to neurons during maturation of nervous tissue. The acetylcholine is a major neurotransmitter of the nervous system and is associated with the maintenance processes of attention, learning and memory. In the synaptic cleft acetylcholine is degraded by the enzyme cholinesterase, the acetylcholinesterase (AChE) and the butyrylcholinesterase (BuChE). Increased activity of fractions of AChE has been associated with states of dementia in elderly patients and the loss of cognitive function in patients with Alzheimer's Disease. This work is proposed to study the expression of neuronal glucose transporter GLUT3 and activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in brain of young adult rats (84 days of life) who were breastfed in litters formed by 6 (control group) or 12 pups (undernourished group). The results showed that the weight of the brains of malnourished rats was significantly lower ($P < 0001$, Student's t test) compared to controls. The blood glucose levels and the expression of GLUT3 in total cortical membranes was also reduced by malnutrition ($P < 0001$, Student's t test). The activity of AChE in different brain homogenate showed a significant interaction ($P = 0019$, two-way ANOVA, Tukey's test) between nutritional status and the type of fraction of the homogenate, with a significant reduction ($p < 0,05$) in activity this enzyme in the brain homogenate in control group. These results show for the first time that malnutrition during the period of weaning reduces the expression of GLUT3 and

that the increased activity of acetylcholinesterase associated with decreased in the expression of the main glucose transporter in the brain could contribute to cognitive deficits and changes in brain metabolic activity.

Keywords: malnutrition, cerebral metabolism, glucose transporters, acetylcholinesterase

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Evolução ponderal dos animais do grupo controle (C) e desnutrido (Desn) a partir do período de desmame e até as 12 semanas posteriores (n = 20 para o grupo controle e n = 26 para o grupo desnutrido).	35
Figura 2 - Peso (g) do cérebro e cerebelo dos animais controle e desnutridos na 12 ^a semana de experimento.....	36
Figura 3 - Glicemia (mg/dL) dos animais controle e desnutridos na 12 ^a semana de experimento	37
Figura 4 - Expressão do transportador GLUT3 no córtex cerebral dos animais controle e desnutridos.....	37
Figura 5 – Conteúdo em proteína (mg/ml) dos extratos de tecido cerebral nos animais controle (n=6) e desnutridos (n=7)	38
Figura 6 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) (U/ml) dos diferentes extratos de tecido cerebral nos animais controle (n=6) e desnutridos (n=7)	39
Figura 7 – Comparação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) (U/ml) nos animais controle (n=6) e desnutridos (n=7).....	40
Figura 8 – Atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) (U/mg prot) dos diferentes extratos de tecido cerebral nos animais controle (n=6) e desnutridos (n=7).....	41
Figura 9 – Comparação da atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) (U/mg) nos animais controle (n=6) e desnutridos (n=7).....	41

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Níveis de garantia para dieta Labina®	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach – Acetilcolina

AChE- Acetilcolinesterase

AMPA – Ácido - α - amino – 3- hidroxí-5-metil-4-isoxazol propiônico

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA - *bovine serum albumin*

BuchE – Butirilcolinesterase

CO – Citocromo Oxidase

DA – Depressão Alastrante

DAG – Diacilglicerol

EAAT – *Excitatory Amino-Acid Transporters*

GLAST – Transportador de L-glutamato/L-aspartato

GLUT – *Glucose Transporter*

HC – homogenado de células

HCC – homogenado de células centrifugado

HCLT – homogenado livre de células com triton

IP3 – Trifosfato de Inositol

LTP – Potencias de Longa Duração

MCT – Transportadores de Monocarboxilato

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NMDA – N-metil-D-aspartato

PBS- *phosphate-buffered saline*

PBST - *phosphate-buffered saline triton*

PKC – Proteína Kinase C

SNC – Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Problematização.....	14
1.2 Problema.....	17
1.3 Hipótese.....	17
1.4 Objetivos.....	17
1.4.1 Objetivo geral.....	17
1.4.2 Objetivos Específicos.....	17
1.5 Justificativa.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Transporte de glicose e metabolismo energético cerebral.....	20
2.2 Atividade colinesterásica no tecido cerebral.....	23
2.3 Efeitos da desnutrição sobre os transportadores de glicose e o metabolismo energético cerebral.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29

3.1 Animais, Grupos Experimentais e Dietas.....	30
3.2 Coleta de dados	31
3.2.1 Glicemia de Jejum.....	31
3.2.2 Análise da Acetilcolinesterase e Dosagem de Proteínas em Tecido Cerebral.....	31
3.2.3 Expressão de transportadores de glicose GLUT3 – Western Blotting	32
3.3 Aspectos Éticos	33
3.4 Análise Estatística.....	33
4 RESULTADOS.....	34
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÕES.....	50
7 REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE: artigo de resultados	62

INTRODUÇÃO

1.1 Problematização

A desnutrição energético-protéica consiste em um dos problemas nutricionais mais graves que ocorrem em países em desenvolvimento, sendo mais freqüente durante o período de desmame, entre 4 e 18 meses de idade (SOARES *et al.*, 2000). Fatores relacionados às condições sócio-econômicas, a falta de saneamento básico e de acesso a sistemas de saúde e educação têm sido implicados na alta prevalência de desnutrição em crianças, especialmente no nordeste brasileiro.

Do ponto de vista biológico, a desnutrição é uma condição clínica originada por deficiências na ingestão alimentar de combustíveis energéticos e micronutrientes, e sua associação com doenças infecciosas (TORUN & CHEM, 2003, KAR *et al.*, 2008). Essa condição pode ser agravada se surge em períodos de crescimento e desenvolvimento corporal, cuja aquisição de nutrientes não supre as atuais necessidades (TORUN & CHEM, 2003).

A desnutrição durante a gestação e/ou lactação é um dos fatores determinantes no surgimento de modificações metabólicas que refletem negativamente no desenvolvimento orgânico pré e pós natal, podendo levar a alterações morfológicas e funcionais de diversos tecidos e órgãos (GAVETE *et al.*, 2005, NUNES *et al.*, 2002). No período de aleitamento, foi observado em roedores que a desnutrição leva a uma diminuição do peso de regiões cerebrais, como o hipocampo e o córtex cerebral, evidenciando-se uma maior vulnerabilidade dessas estruturas à agressão nutricional precoce (FULLER & WIGGINS, 1984).

A deficiência energética e nutricional no início da vida causa um grande impacto sobre o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), uma vez que durante este período, os processos de hiperplasia, hipertrofia e mielinização ocorrem de forma mais intensa (DOBBING, 1968). Os efeitos da desnutrição sobre o sistema nervoso levam a alterações do peso do encéfalo, modificação de sistemas de neurotransmissores e distúrbios na capacidade do tecido cerebral em responder a variações de glicemia. Esses efeitos são mais graves se a desnutrição for de longa duração e/ou atingir o período de desenvolvimento rápido do encéfalo. Redução do número de neurônios (MORGANE *et al.*, 1978), mielinização deficitária (KRIGMAM & HOGAN, 1976) e alterações do sistema de

neurotransmissores (STERN *et al.*, 1975) foram constatadas durante a desnutrição.

O período de desenvolvimento crítico do Sistema Nervoso Central difere entre as espécies animais. No ser humano, ela ocorre no período que compreende o último trimestre de gestação até os primeiros anos de vida (2-4 anos); no rato ocorre no período de aleitamento (SCRIMSHAW & GORDON, 1968).

No SNC, regiões como o córtex cerebral, o hipocampo e o cerebelo, são mais susceptíveis ao efeito deletério da desnutrição neste período (NUNES *et al.*, 2002).

Diversos estudos vêm sendo realizados no sentido de demonstrar os efeitos da desnutrição sobre o metabolismo cerebral e sua repercussão na idade adulta (BENNIS-TALEB *et al.*, 1999; KELLER *et al.*, 1990), especialmente no que diz respeito à capacidade cognitiva (KAR *et al.*, 2008), à oferta (BENNIS-TALEB *et al.*, 1999) e à utilização de substratos energéticos e às alterações do sistema de neurotransmissores (KELLER *et al.*, 1990, YUCEL *et al.*, 1994). Essas alterações podem estar envolvidas com mecanismos adaptativos (KELLER *et al.*, 1990) ou ser conseqüência de modificações celulares que determinam mudanças metabólicas.

No SNC, os astrócitos são células que possuem um importante papel no metabolismo da glicose (PELLERIN & MAGISTRETTI, 2004), principal substrato energético para o cérebro, e na síntese de glutathione, um derivado de aminoácidos que participa do sistema de defesa antioxidante das células (FEOLI *et al.*, 2006). Tais processos são ativados pelo co-transporte de glutamato e Na⁺ para os astrócitos (PELLERIN & MAGISTRETTI, 2004).

A desnutrição altera o metabolismo do glutamato e a neurotransmissão glutaminérgica, promovendo conseqüências sobre o metabolismo energético e submetendo o tecido cerebral a uma condição de estresse oxidativo devido à redução da defesa antioxidante, tornando-o vulnerável à excitotoxicidade (FEOLI *et al.*, 2006).

Nas duas primeiras semanas de vida pós-natal os níveis dos transportadores de glicose, GLUT1 e GLUT3, em cérebros de ratos, são baixos;

porém, aumentam consideravelmente com a maturação cerebral e a sinaptogênese (VANNUCCI, 1994). Certas condições fisiológicas e patológicas tais como o crescimento e desenvolvimento, mudanças na demanda metabólica de glicose, hipoglicemia e hiperglicemia, alteram a expressão dos transportadores de glicose no cérebro.

Além dos efeitos a curto prazo e longo prazo, o processo de desnutrição nesta fase de desenvolvimento, mesmo que revertido com a oferta nutricional adequada, pode levar a prejuízos que repercutem na vida adulta especialmente no que diz respeito a alterações no metabolismo energético em vários tecidos, como músculo cardíaco e esquelético, com redução da expressão de transportadores de glicose para estes tecidos (GAVETE *et al.*, 2002; AGOTE *et al.*, 2001) e ao aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em regiões como o cerebelo, estriado e hipotálamo (VILESKAS *et al.*, 1980). O aumento da atividade colinesterásica vem sendo relacionada a estados de demência em pacientes com perda da função cognitiva (BLOKLAND, 1996).

A acetilcolina é um dos principais neurotransmissores do Sistema Nervoso e vem sendo associada à manutenção de funções cognitivas, de aprendizado e memória (BLOKLAND, 1996). Sua hidrólise ocorre na fenda sináptica por ação de uma enzima, a acetilcolinesterase (AChE) que apresenta isoformas ligadas à membrana e distribuídas na fenda sináptica (DAS *et al.*, 2005).

A desnutrição no início da vida seguida de reabilitação nutricional após o desmame, induz um aumento da atividade da AChE em diversas regiões cerebrais de animais adultos (VILESKAS *et al.*, 1980).

Dentre os modelos de desnutrição experimental, o uso de uma dieta baseada em alimentos popularmente consumidos na década de 1980 pela população menos favorecida da Zona da Mata do Nordeste Brasileiro (TEODÓSIO *et al.*, 1990, XIMENES-DA-SILVA & GUEDES, 1991), bem como a técnica de aumento do tamanho da ninhada de animais vêm sendo utilizados (ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2004).

Rocha-de-Melo *et al* (2004) observaram que a desnutrição ocasionada pela redução do aporte alimentar devido à competição entre filhotes de grandes ninhadas levava à redução do peso corporal e encefálico nestes animais. Os aspectos relacionados ao transporte da glicose cerebral e a atividade

colinesterásica em tecido cerebral de animais desnutridos pelo aumento do número de filhotes na ninhada ainda não foram estudados.

Desta forma, o presente estudo visa averiguar, em roedores, se a desnutrição durante a fase de desenvolvimento crítico do SNC alteraria a expressão do transportador de glicose cerebral – GLUT3. Além de analisar os efeitos da desnutrição no início da vida sobre a atividade colinesterásica em cérebro de ratos adultos.

1.2 Problema

A desnutrição durante a fase crítica de desenvolvimento cerebral em ratos promove alterações na expressão do transportador de glicose – GLUT3 e na atividade da acetilcolinesterase em cérebro de animais adultos?

1.3 Hipótese

Ratos submetidos à desnutrição durante a fase crítica de desenvolvimento cerebral apresentam alterações na expressão do transportador de glicose cerebral – GLUT3 na vida adulta, assim como no sistema de neurotransmissão colinérgica.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da desnutrição durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso sobre a expressão do transportador de glicose GLUT3 e a atividade colinesterásica, em tecido cerebral de ratos adultos.

1.4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a expressão do transportador de glicose – GLUT3 neuronal no córtex cerebral;
- ✓ Determinar a atividade da acetilcolinesterase em tecido cerebral do animal adulto;

- ✓ Avaliar a repercussão da desnutrição no início da vida sobre a glicemia do animal adulto;
- ✓ Avaliar a repercussão da desnutrição no início da vida sobre o peso do encéfalo.

1.5 Justificativa

A Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (PNSN) de 1989 revelou que 31% das crianças brasileiras menores de cinco anos apresentavam alguma forma de desnutrição (ROMANI & LIRA, 2002). Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1992) demonstraram que, no Brasil, 15,4% das crianças menores de cinco anos são atingidas pela desnutrição crônica, sendo que o maior contingente encontra-se nas regiões Norte (23,0%) e Nordeste (27,3%).

Estudo recente sobre as condições antropométricas de crianças, menores de 10 anos, que vivem em condições de baixa renda no município de Maceió – AL, revelou que 3,8% apresentavam redução de peso, 8,3% redução de crescimento, e 8,7% redução dos dois parâmetros associados (FLORÊNCIO, *et al.*, 2001).

Diante disso, a realização desta investigação contribuirá para um melhor entendimento dos efeitos da privação nutricional sobre a expressão de transportadores de glicose no tecido neuronal, bem como sobre modificações na neurotransmissão colinérgica cerebral.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Transporte de Glicose e Metabolismo Energético Cerebral

O cérebro humano corresponde a 2% do peso corporal total; no entanto, as reações metabólicas desse órgão requerem o consumo de 25% da glicose e de 20% do oxigênio que são destinados ao metabolismo corporal total. Esses altos requerimentos de combustíveis metabólicos estão estritamente relacionados a um importante fluxo sanguíneo cerebral de cerca de 57 ml/100g/min.

O metabolismo energético cerebral requer a utilização de glicose pela via glicolítica e fosforilação oxidativa que ocorrem de forma compartimentalizada nos diferentes tipos de células nervosas. Porém, a glicose não é o único substrato energético utilizado pelo cérebro; em algumas situações, como em períodos hipoglicêmicos, o cérebro utiliza corpos cetônicos e lactato como alternativas energéticas, evidenciando uma habilidade de oxidar outros substratos energéticos, além da glicose (PELLERIN & MAGISTRETTI, 2004).

O transporte de glicose para as células necessita da presença de transportadores específicos denominados GLUTs (*glucose transporters*). A família dos GLUTs inclui 12 proteínas de membrana distintas que realizam o transporte de glicose para o interior de células, através do processo de difusão facilitada. No tecido cerebral, três isoformas da família dos GLUTs participam do transporte de glicose: GLUT1-55kDa, presente principalmente nas células endoteliais da barreira hemato-encefálica; GLUT1-45kDa, presente nas células da glia; e o GLUT3, o transportador de glicose predominante nos neurônios (HARIK *et al.*, 1990; BONDY *et al.*, 1992).

Nagamatsu *et al.*, (1992, 1993), ao estudar a expressão e distribuição de transportadores de glicose no cérebro de roedores, identificaram a expressão, em níveis elevados, de uma proteína que realiza o transporte de glicose neuronal – GLUT3, no hipocampo, córtex e cerebelo. Normalmente, a expressão de transportadores de glicose GLUT1 e GLUT3 encontra-se elevada em regiões onde o metabolismo energético e a utilização de glicose é intensa (VANNUCCI, 1997).

O cérebro imaturo possui um número reduzido de transportadores de glicose, GLUT1 e GLUT3 que aumenta com a maturação cerebral após a segunda semana de vida (VANNUCCI, 1994). Além dos GLUTs, proteínas que

fazem parte de uma família de carreadores que são responsáveis pelo transporte neuronal de lactato, corpos cetônicos e piruvato, participam do fornecimento de substratos energéticos aos neurônios (PELLERIN *et al.*, 1998, VANNUCCI & SIMPSON, 2003), sendo denominadas transportadores de monocarboxilatos (MCTs).

O MCT1 parece estar associado com o fornecimento de combustíveis para o cérebro durante o processo de maturação, devido a uma maior expressão de RNAm para MCT1 na barreira hematoencefálica, neurônios e células da glia de animais jovens (VANNUCCI & SIMPSON, 2003). O transportador MCT2 é predominantemente encontrado nos neurônios e está associado a vias de sinalização metabólicas nessas células (PIERRE & PELLERIN, 2005).

O cérebro é um órgão heterogêneo, onde as diferentes regiões apresentam perfis metabólicos variados e onde os sistemas de regulação do metabolismo se efetuam em nível regional, local e celular, demonstrando grande capacidade do cérebro em regular o seu próprio metabolismo e manter as condições que assegurem sua funcionalidade.

Vários estudos têm demonstrado que entre as células nervosas existe um “tráfego metabólico”, ou seja, uma transferência de metabólitos entre os neurônios e as células da glia, a fim de manter uma eficiência na geração e utilização de energia pelo cérebro (TSACOPOULOS & MAGISTRETTI, 1996; SCHURR *et al.*, 1999, LAMING *et al.*, 2000), mediada pelo glutamato.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, e seus níveis extracelulares são extremamente controlados pela recaptação pré-sináptica e pelo seu transporte para o interior das células, através de uma família de cinco transportadores de alta afinidade pelo glutamato – *excitatory amino-acid transporters* - EAAT, com características moleculares distintas, expressos em tipos celulares diferentes, especialmente nos astrócitos (BEART & O'SHEA, 2007), limitando a estimulação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) pelo glutamato, e protegendo contra o efeito neurotóxico dessa estimulação (FURUTA *et al.*, 1997).

O EAAT1 (homólogo humano do transportador de L-glutamato/L-aspartato - GLAST) está presente em todas as células da glia do SNC. O EAAT2 é quase

exclusivamente glial e é altamente disseminado em todo o SNC. Os transportadores EAAT3 e EAAT4 são expressos predominantemente nos neurônios, sendo o EAAT4 localizado nas células de Purkinje do cerebelo (DANBOLT, 2001; O'SHEA, 2002; KANAI & HEDIGER, 2004). O EAAT5 está presente nos fotorreceptores e células bipolares da retina (ARRIZA *et al.*, 1997; POW & BARNETT, 2000).

Nos astrócitos, o glutamato é utilizado para a síntese de glutathiona, um tripeptídeo formado pelo glutamato, cisteína e glicina, que participa do sistema de defesa antioxidante (FEOLI *et al.*, 2006).

Sabe-se que as células da glia, especialmente os astrócitos, têm capacidade de produzir lactato em situações aeróbicas (WALZ & MUKERJI, 1988). Nestas condições, o aumento da atividade neuronal promove a liberação de glutamato que é co-transportado para os astrócitos com três íons Na^+ através de transportador para glutamato (EAAT1), ativando a bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ e causando aumento da captação de glicose pelo aumento da necessidade energética celular. Assim, os astrócitos transformarão preferencialmente a glicose em lactato, o qual será transportado para os neurônios, através de transportadores de monocarboxilatos (PELLERIN & MAGISTRETTI, 1994).

Nos neurônios, o lactato é convertido em piruvato pela ação da lactato desidrogenase. O piruvato, por sua vez, seria utilizado pelo ciclo de Krebs com formação de coenzimas reduzidas, que seriam usadas na cadeia de transporte de elétrons para geração de ATP pela fosforilação oxidativa (PELLERIN & MAGISTRETTI, 2004).

A última etapa da fosforilação oxidativa ocorre na membrana interna da mitocôndria, pela ação da enzima citocromo oxidase (CO). Essa enzima tem sido utilizada como marcador de atividade metabólica dos neurônios, uma vez que a produção de ATP em neurônios é predominantemente realizada através da fosforilação oxidativa (WONG-RILEY, 1989).

O aumento da atividade neuronal é caracterizado pelo aumento da demanda e, por conseguinte, da geração de ATP, devido à intensa atividade da bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, necessária a repolarização da membrana. O controle respiratório das células é exercido pela concentração de ADP; assim, quando

ocorre o acúmulo de ADP pela hidrólise do ATP, o transporte de elétrons e o fluxo de prótons pela ATP sintase são acelerados, aumentando a atividade da citocromo oxidase (WONG-RILEY, 1989). Condições que levam a uma diminuição do aporte energético para o cérebro têm por efeito levar a uma redução da atividade da CO (GALLAGHER *et al.*, 2005).

A combinação entre os MCTs e os GLUTs no transporte de combustíveis energéticos para o cérebro é uma condição importante, principalmente para atender à elevada demanda metabólica pós-natal, relacionada à maturação neuronal, à atividade sináptica, à síntese de lipídeos e formação da bainha de mielina (VANUCCI & SIMPSON, 2003).

2.2 Atividade Colinesterásica em Tecido Cerebral

A acetilcolina é um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso, secretada na junção neuromuscular, nos gânglios do sistema nervoso autônomo e em vários sítios do SNC, sendo associada em diversos estudos com a manutenção de processos de atenção e na correlação entre aprendizagem e memória (BLOKLAND, 1996; WILSON *et al.*, 2004), bem como no controle do fluxo sanguíneo cerebral (SÁEZ-VALERO *et al.*, 2003).

A síntese da acetilcolina acontece através da condensação da Acetil-CoA com a colina, captada ativamente do líquido extracelular, sendo catalisada pela enzima colina acetiltransferase, encontrada no citoplasma de terminações nervosas colinérgicas (DAS *et al.*, 2005).

Na fenda sináptica a acetilcolina é degradada por enzimas colinesterásicas, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE). A AChE é expressa principalmente no cérebro, músculo esquelético e eritrócitos. Já a BuChE está presente nos tecidos periféricos, músculo cardíaco, liso, pele e plasma (AMICI *et al.*, 2001).

A AChE, uma serina hidrolase que realiza a degradação da acetilcolina na fenda sináptica, é considerada um indicador de atividade colinérgica (DAS *et al.*, 2005). Diversos estudos mostram a existência de várias isoformas globulares de AChE expressas em cérebros de mamíferos; algumas isoformas podem ter sua atividade aumentada em estados metabólicos distintos (SÁEZ-VALERO *et al.*, 2002).

Estas isoformas de AChE estão distribuídas na fenda sináptica fazendo parte da fração solúvel, enquanto que outras apresentam-se fixadas à membrana celular por âncoras glicolípídicas (DAS *et al.*, 2005). As isoformas de maior atividade em cérebros de mamíferos são tetrâmeros (G4) e monômeros (G1), sendo as espécies diméricas (G2) as que possuem menor atividade colinesterásica. A isoforma G4 encontra-se ligada à membrana celular, enquanto que as demais isoformas, apresentam-se na fenda sináptica, sendo denominadas de fração solúvel (DAS *et al.*, 2005).

O decréscimo da atividade colinérgica e o aumento da atividade de frações da AChE vem sendo associada com estados de demência em pacientes idosos, e com a perda da função cognitiva em pacientes com Doença de Alzheimer (BLOKLAND, 1996). Este último caso está relacionado à deposição do peptídeo β -amilóide, envolvido no aumento da atividade colinesterásica de G1 (SÁEZ-VALERO *et al.*, 2002).

A subnutrição também pode levar a uma redução na densidade de receptores muscarínicos em regiões cerebrais, como o córtex motor e somatossensorial, em ratos submetidos à restrição energético-protéica (VIANA *et al.*, 1997).

2.3 Efeitos de Tratamentos Dietéticos sobre o Transporte de Glicose e o Metabolismo Energético Cerebral

Alterações do estado nutricional podem induzir mudanças no perfil metabólico cerebral. Estudos utilizando animais alimentados com uma dieta multideficitária baseada no consumo alimentar de populações menos favorecidas da Zona da Mata do Nordeste Brasileiro, mostraram que a desnutrição limitava a resposta cerebral a variações agudas da glicemia. Nos animais hipo ou hiperglicêmicos, a estimulação da superfície do córtex cerebral dos animais desnutridos, que desencadeia a propagação de variação lenta de voltagem que caracteriza a depressão alastrante (DA), não se adaptava às alterações da disponibilidade de glicose, como observado nos animais que receberam uma dieta controle (XIMENES-DA-SILVA & GUEDES, 1991). A velocidade de propagação da depressão alastrante, fenômeno eletrofisiológico propagável em tecido nervoso de várias espécies animais (LEÃO, 1944), é alterada pelo estado

nutricional e essas modificações são mais importantes quando atingem a fase de desenvolvimento crítico do encéfalo (ANDRADE *et al.*, 1990; ROCHA DE MELO & GUEDES, 1997). Esses estudos demonstram que a desnutrição altera a funcionalidade cerebral e, dentre as várias alterações, destaca-se a alteração da capacidade das células nervosas na utilização de substratos energéticos.

O transporte de glicose para neurônios e astrócitos é realizado por duas principais isoformas de transportadores de glicose, o GLUT1, presente nas células endoteliais da barreira hematoencefálica e células da glia, e o GLUT3 em neurônios, principalmente em regiões com alta densidade sináptica (PIFFERI *et al.*, 2005). A expressão dos transportadores de glicose, no tecido cerebral pode estar alterada em condições distintas de deficiências nutricionais (XIMENES-DA-SILVA *et al.*, 2002; CHENG *et al.*, 2003).

O uso de dietas cetogênicas com restrição calórica em animais promove um aumento da expressão de GLUT1 e 3, em tecido cerebral. Por outro lado, dietas com restrição calórica sem aumento proporcional do conteúdo de lipídeos tem o efeito de reduzir a expressão neuronal do GLUT3, demonstrando que o transporte de glicose para os neurônios pode estar comprometido (CHENG *et al.*, 2003), promovendo alterações no metabolismo energético cerebral (PIFFERI *et al.*, 2005).

A deficiência de ácidos graxos da série ômega-3 também tem efeitos sobre as proteínas transportadoras de glicose. Neste caso, a deficiência promove alterações na composição lipídica da membrana, promovendo a redução dos níveis de ácido docosaexaenóico (DHA) em até 50%, compensada por um aumento de ácidos graxos da série ômega 6 (ácido araquidônico – AA). Contudo, o córtex cerebral manteve uma quantidade elevada de DHA, quando comparado às células endoteliais (PIFFERI *et al.*, 2005).

O conteúdo de DHA participa da regulação de diversas proteínas de membrana, incluindo os transportadores de glicose (PIFFERI *et al.*, 2005). Ximenes-da-Silva *et al.* (2002) demonstraram uma redução da captação de 2-desoxiglicose em animais deficientes em ácidos graxos ômega 3.

Esses estudos demonstram que a deficiência de ácidos graxos ômega 3 reduz a expressão do transportador GLUT1 em células endoteliais e em astrócitos influenciada pela proporção maior de AA nos fosfolipídeos de membrana, porém

não altera (PIFFERI *et al.*, 2005) ou promove um aumento da expressão neuronal de GLUT3 (XIMENES-DA-SILVA *et al.*, 2002). O GLUT1 tem uma participação importante na captação de glicose pelo astrócito e produção de lactato, que é transferido através de transportadores de monocarboxilatos (MCTs) para os neurônios, onde é utilizado como fonte de energia por estas células (PELLERIN & MAGISTRETTI, 1994).

Ximenes-da-Silva *et al.* (2002) observaram que os cérebros de animais submetidos à uma dieta com deficiência de ácido graxo α -linolênico apresentavam uma redução na imunorreatividade da proteína transportadora de glicose GLUT1 e um aumento da imunorreatividade ao GLUT3. Por outro lado, a captação de glicose e a atividade da enzima citocromo oxidase encontravam-se deprimidas nos animais deficientes. A redução da oferta de lactato aos neurônios, pode causar um aumento do GLUT3 como um mecanismo compensatório para o fornecimento de energia para os neurônios (XIMENES-DA-SILVA *et al.*, 2002). Essas alterações foram observadas em 3 regiões cerebrais de alta taxa metabólica: córtex cerebral, hipocampo e núcleo supraquiasmático.

A atividade da enzima citocromo oxidase em animais submetidos à desnutrição antes e após o nascimento sofre uma redução de 49% e 20%, respectivamente (GALLAGHER *et al.*, 2005). Essa redução pode estar associada à diminuição do número de dendritos em animais submetidos à desnutrição intrauterina, visto que os dendritos apresentam uma alta concentração de enzimas que participam da respiração celular (BENÍTEZ-BRIBIESCA *et al.*, 1999), ou representa uma resposta adaptativa à redução do aporte energético como um mecanismo para a sobrevivência. A persistência desse efeito sobre a vida pós-natal pode trazer repercussões sobre a função cerebral em outras fases da vida (GALLAGHER *et al.*, 2005)

Além de alterações metabólicas, foi demonstrado que a desnutrição parece causar uma redução na perfusão sanguínea do tecido cerebral, constatada por uma redução na densidade de vasos sanguíneos no córtex cerebral de animais submetidos à restrição protéica, situação essa que persiste até a vida adulta, mesmo quando as condições de oferta de nutrientes são restabelecidas (BENNIS-TALEB *et al.*, 1999). A redução da irrigação sanguínea do córtex cerebral poderia

contribuir para a redução na disponibilidade de substratos energéticos utilizados pelo cérebro.

Durante o estado de ativação neuronal, o transporte de glutamato, liberado na fenda sináptica, através de proteínas transportadoras de glutamato presentes nas membranas das células da glia, representa um dos principais mecanismos de defesa para a manutenção de concentrações não-tóxicas de glutamato no fluido extracelular (DANBOLT, 2001). Esse transporte também está associado ao aumento do metabolismo energético e à produção de lactato nos astrócitos. Animais desnutridos pelo uso de uma dieta hipoprotéica apresentaram uma redução da captação de glutamato no córtex cerebral e hipocampo (FEOLI *et al.*, 2006), limitando a produção de lactato nos astrócitos, o seu transporte para os neurônios e reduzindo a oferta de combustíveis necessários ao desenvolvimento adequado do tecido cerebral, principalmente no início da vida, quando os MCTs têm papel fundamental na oferta energética (VANNUCCI & SIMPSON, 2003).

As modificações na neurotransmissão glutaminérgica e no metabolismo do glutamato podem estar relacionada a aspectos anormais da atividade cerebral (DANBOLT, 2001), como redução das defesas antioxidantes (FEOLI *et al.*, 2006), da produção de energia, e toxicidade de altas concentrações de glutamato no fluido extracelular (DANBOLT, 2001)

Outra conseqüência da redução da captação de glutamato pelos astrócitos em animais desnutridos é a diminuição da entrada de cisteína dependente de glutamato, reduzindo os níveis de glutathione nos astrócitos e, conseqüentemente, comprometendo a defesa antioxidante nestas células, mesmo quando o aumento na produção de radicais livres não é observado (FEOLI *et al.*, 2006).

A redução da captação do glutamato pelos astrócitos em animais desnutridos (FEOLI *et al.*, 2006) pode levar a mudanças na neurotransmissão mediada pelo glutamato, principal neurotransmissor excitatório cerebral. O aumento das concentrações de glutamato na fenda sináptica tem sido relacionado com lesões neuronais, processo denominado excitotoxicidade (BEART & O'SHEA, 2007).

O glutamato atua sobre vários tipos de receptores acoplados a canais iônicos (ionotrópicos) ou ligados a uma proteína G (metabotrópicos). Os

receptores do tipo Ácido α -amino – 3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) são canais de sódio, já os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) quando estimulados, permitem o influxo de cálcio para o neurônio e sua despolarização depende da estimulação sinérgica dos receptores AMPA, localizados no mesmo neurônio. Os receptores NMDA induzem a formação dos potenciais de longa duração (LTP - *long term potentiation*), através da ativação de enzimas (PKC - fosfoquinase C, e calmodulina) dependentes dos níveis intracelulares de cálcio. Esse processo é realimentado pela ativação de um receptor metabotrópico que através de segundos mensageiros (Trifosfato de inositol - IP3 e diacilglicerol- DAG) mantém as concentrações intracelulares de cálcio e a excitabilidade pós-sináptica elevadas. Quando a excitabilidade é exacerbada pela estimulação de receptores NMDA, o influxo de cálcio ativa proteases envolvidas na degradação proteica e sistemas enzimáticos dependentes de cálcio, que levará à peroxidação lipídica e à apoptose celular (THADEU, 1998). A excitotoxicidade é mantida, uma vez que o cálcio intracelular estimula a liberação de glutamato pelo terminal axônico, induzindo a apoptose de células adjacentes.

Alguns estudos tentam demonstrar os efeitos da desnutrição sobre o limiar de crises convulsivas, evidenciando alterações fisiológicas e morfológicas sobre o SNC e a redução do limiar de estados convulsivos (PALENCIA *et al.*, 1996; COSTA-CRUZ *et al.*, 2006). No entanto, a reabilitação nutricional precoce, parece exercer efeito protetor reduzindo a susceptibilidade de ratos a estados convulsivos.

A desnutrição compromete as defesas antioxidantes, reduzindo os níveis de glutatona e aumentando a vulnerabilidade ao estresse oxidativo cerebral, principalmente durante períodos de intenso metabolismo e desenvolvimento cerebral, quando este tecido apresenta-se bastante sensível aos danos oxidativos (FEOLI *et al.*, 2006). Diversas patologias caracterizadas pela neurodegeneração estariam associadas ao estresse oxidativo no tecido cerebral, como a Doença de Parkinson e a Doença de Alzheimer (FEOLI *et al.*, 2006, BEART & O'SHEA, 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais, grupos experimentais e dieta

Foram utilizadas matrizes de ratos albinos suíços da espécie *Wistar*, provenientes da colônia do Biotério Central (BIOCEN) da Universidade Federal de Alagoas. Após 21 dias em companhia de um macho para cada três fêmeas, as matrizes foram colocadas em gaiolas individuais e receberam água e dieta padrão Labina® *ad libitum* durante toda a gestação e aleitamento.

Após nascimento dos filhotes, foi realizada uma randomização onde os animais foram postos em grupos de ninhada média (6 filhotes por matriz) e grupos de ninhada grande (12 filhotes por matriz) (ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2004).

Após 21 dias de amamentação, os animais foram desmamados e somente os machos fizeram parte dos grupos experimentais. Os animais que foram submetidos a ninhadas de grande tamanho, constituíram o grupo desnutrido (n=26), e os animais submetidos a ninhadas de tamanho médio constituíram o grupo controle (n = 20).

Logo após o desmame, eles passaram a receber a mesma dieta padrão oferecida às matrizes até atingirem a vida adulta, sendo mantidos em gaiolas coletivas com no máximo 4 animais por gaiola e pesados semanalmente para evolução da curva ponderal

Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS, sob controle ambiental de temperatura entre $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro 12/12h, e receberam dieta e água *ad libitum*.

A Tabela 01 demonstra os níveis de garantia para alguns nutrientes da dieta Labina®.

Tabela 01 – Níveis de garantia para dieta Labina®

NÍVEIS DE GARANTIA	
Umidade (Max)	12%
Proteína Bruta (Min)	23%
Extrato Etéreo (Min)	4%
Matéria Fibrosa (Max)	5%
Matéria Mineral (Max)	10%
Cálcio (Max)	1,5%
Fósforo (Min)	0,85%

3.2 Coleta de dados

3.2.1 – Glicemia de Jejum

Na idade adulta, após 12 semanas do desmame, os animais foram postos em jejum de 12 horas, e uma amostra de sangue foi coletada por punção da região distal da cauda para verificação da glicemia, com auxílio de um glicosímetro tipo Prestige IQ® e logo em seguida, sacrificados.

3.2.2 – Análise da Acetilcolinesterase e dosagem de proteínas em tecido cerebral

Os animais foram sacrificados por decapitação após anestesia com tiopental sódico (50 mg/Kg de peso corporal) e o cérebro e o cerebelo foram rapidamente retirados, pesados e congelados em isopentano para em seguida serem estocados a -20°C. O hemisfério direito foi utilizado para análise de atividade da acetilcolinesterase e dosagem de proteína por método colorimétrico (LOWRY *et al.*, 1951).

O hemisfério cerebral direito foi macerado com solução fisiológica (NaCl 0,9%) numa proporção de 80mg de tecido cerebral para cada 1 ml de solução fisiológica, para produção do extrato que foi dividido em três amostras.

A primeira amostra (homogenado de células - HC) não sofreu nenhum tipo de tratamento até o momento da dosagem. A segunda amostra (homogenado de células centrifugado - HCC) foi submetida a centrifugação sob refrigeração (4°C) durante 10 min a uma frequência de 12000 rpm e utilizado na dosagem somente o sobrenadante (sem células). A terceira amostra foi submetida a 3 ciclos de 20s cada no ultrassom para rompimento de células, logo após subdividida em duas amostras, uma sem o uso de triton (homogenado livre de células - HLC) para dosagem de proteína, e a outra com adição de triton 0,5% (homogenado livre de células com triton- HLCT) para solubilização das membranas rompidas e dosagem da AchE.

Todas as amostras foram mantidas em gelo até o momento das dosagens. Para dosagem da atividade da AChE foram utilizados o HC (diluição de 1:100), o extrato centrifugado HCC (diluição de 1:50) e o extrato livre de células com triton

0,5%- HLCT (diluição de 1:100). A atividade da AChE foi determinada pelo método de Ellman *et al.* (1961). Para dosagem foi utilizada a Acetilcolina, como substrato, adicionada à cubeta no momento da leitura. Foi calculada a variação da absorbância em um período de 5 min, levando em consideração o fator de extinção do DTNB e o fator de diluição da amostra. Com base nos dados da espectrofotometria, foi calculada a atividade total da AChE (U/ml) e a atividade específica da AChE (U/mg de proteína).

Para dosagem de proteína foram utilizados o HC (diluição de 1:100), o HCC (diluição de 1:50) e o HLC (diluição de 1:100).

3.2.3 – Expressão do transportador de glicose GLUT3 - *Western blotting*

O hemisfério cerebral esquerdo foi submetido aos procedimentos de Western blotting, segundo Ximenes-da-Silva *et al.* (2002), com modificações. O córtex cerebral de cada animal foi dissecado e homogeneizado por processamento mecânico em tampão Tris HCl 10mM e EDTA 2 mM, pH 7,4, contendo um coquetel de inibidor de proteases (Sigma). Os homogenatos foram centrifugados a 1000 g por 10 min à 4°C e, em seguida, a 16000 g por 10 min à 4°C, para obtenção das proteínas. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de BCA (*Bicinchoninic acid*).

Amostras de proteínas (25 µg), em triplicata, foram diluídas em gel para eletroforese SDS-PAGE 10 % (*sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide*), de acordo com o método de Laemmli (1970). As proteínas foram transferidas por eletroforese em tampão Tris-glicina, pH 7,4 (30 V a 4°C, *overnight*) para membranas de nitrocelulose (Biorad) e os sítios de ligação não-específicos foram bloqueados em solução contendo 1% BSA (*bovine serum albumin*) + 10 % leite desnatado, a temperatura ambiente, por 1 hora. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-GLUT3 (1:1500, Millipore) e anti-beta actina (1:5000) diluídos em PBST 0,1 % + leite em pó desnatado 1 % , e incubados a 4°C, *overnight*. Após enxágües em PBST as membranas foram incubadas com anticorpos secundários fluorescentes *anti-goat IRDye* (1:5000) e *anti-mouse Alexa Fluo* (1:5000) (LI-COR) diluídos em PBST + leite em pó desnatado 1 %, por 2 horas, a temperatura ambiente. A detecção e quantificação

do sinal foi realizada através de sistema de detecção em *scanner infrared* (*Odyssey infrared detection system*, LI-COR).

A expressão do GLUT3 foi calculada através da variação da densidade óptica das bandas e sua correlação com a proteína controle actina e expressa em valores percentuais.

3.3 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, obtendo aprovação (processo nº 23065.016959/2006-10).

3.4 Análise Estatística

Os dados relativos ao peso corporal, glicemia, quantificação protéica e atividade da acetilcolinesterase foram avaliados utilizando-se o teste *t* de Student. Utilizou-se a análise de variância de uma via para análise dos diferentes tipos de extrato em um mesmo grupo experimental, e a análise de variância de duas vias para testar a influência do estado nutricional e do tipo de extrato sobre a atividade da AChE. Utilizou-se o teste de Tukey para análise da interação entre as variáveis.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

O aumento do número de filhotes por ninhada com o objetivo de induzir desnutrição protéico-calórica causou uma redução significativa no peso corporal dos animais do grupo desnutrido no desmame e nas 3 semanas seguintes a esse período, em comparação ao grupo controle (figura 1). A evolução ponderal dos grupos controle e desnutrido durante as doze semanas seguintes ao desmame é mostrada na figura 1. Diferenças significativas de peso foram encontradas nos seguintes períodos: desmame, grupo controle $37,05g \pm 3,86$ e grupo desnutrido $29,27g \pm 1,65$ ($P < 0,001$); semana 1, grupo controle $67,65g \pm 8,18$, grupo desnutrido $58,81g \pm 4,02$ ($P < 0,001$); semana 2, grupo controle $105,40g \pm 10,45$, grupo desnutrido $94,08g \pm 4,53$ ($P < 0,001$); semana 3, grupo controle $143,70g \pm 11,33$, grupo desnutrido $133,81g \pm 6,45$ ($P < 0,05$), teste *t* de Student.

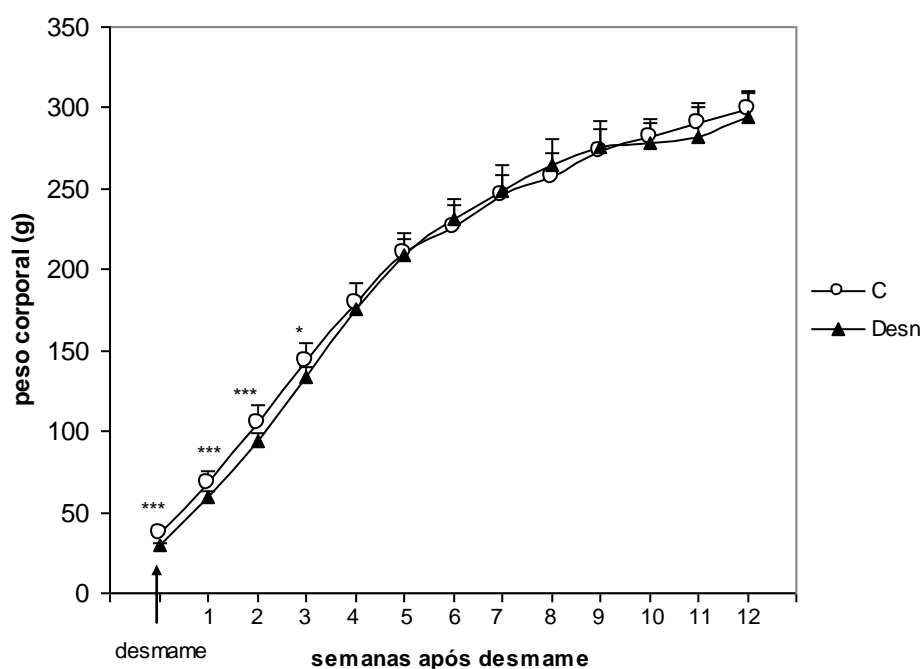


Figura 1 - Evolução ponderal dos animais dos grupos, controle (C) e desnutrido (Desn), a partir do período de desmame e até as 12 semanas posteriores ($n = 20$ para o grupo controle e $n = 26$ para o grupo desnutrido). Os círculos representam a média dos pesos corporais dos animais controle e os triângulos as médias dos pesos dos animais do grupo desnutrido e seus respectivos desvios padrões. *** $P < 0,001$ e * $P < 0,05$, teste *t* de Student.

A partir da 4ª semana de experimento, o peso corporal dos animais desnutridos não apresentou diferença significativa com relação ao grupo controle.

A avaliação do peso encefálico, parâmetro para se identificar a instalação de sequelas crônicas resultantes de um quadro de desnutrição, revelou uma diminuição significativa entre o peso do cérebro dos animais desnutridos ($1,186\text{g} \pm 0,016$), quando comparado aos animais controle ($1,245\text{g} \pm 0,025$) ($P < 0,001$ teste *t* de Student). Porém, o peso do cerebelo não apresentou diferença significativa (figura 2).

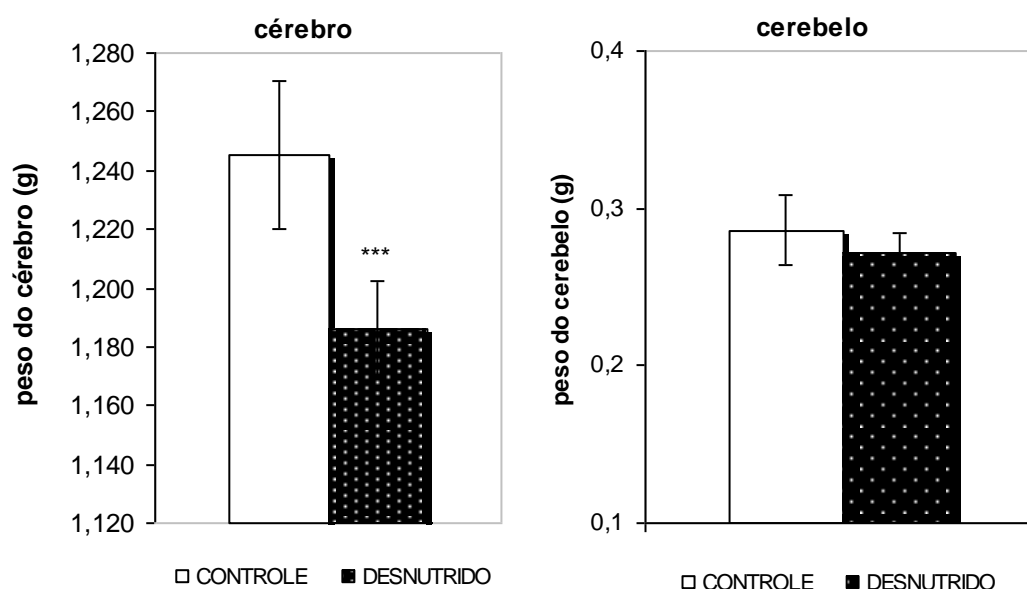


Figura 2- Peso (g) do cérebro e do cerebelo dos animais controle e desnutridos na 12^a semana de experimento. As barras representam a média do peso do cérebro e do cerebelo dos animais \pm o desvio padrão da média ($n = 10$ para o grupo controle e $n = 9$ para o grupo desnutrido). *** $P < 0,001$, teste *t* de Student.

Com relação às variações glicêmicas, observou-se que a glicemia de jejum apresentou-se significativamente menor no grupo desnutrido, $52,79\text{mg/dL} \pm 6,3$, quando comparado ao grupo controle $64,4\text{mg/dL} \pm 6,73$ ($P < 0,001$ teste *t* de Student), conforme mostrado na figura 3.

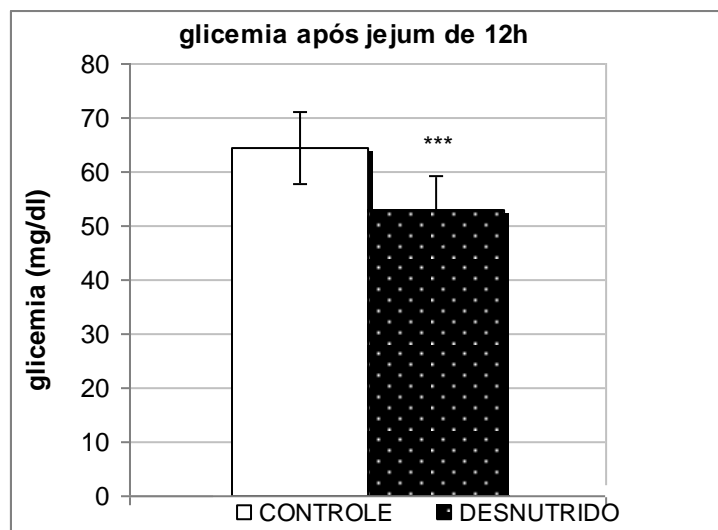


Figura 3- Glicemia (mg/dL) dos animais controle e desnutridos na 12ª semana de experimento. As barras representam a glicemia média \pm o desvio padrão da média (n = 20 para o grupo controle e n = 19 para o grupo desnutrido). *** $P < 0,001$, teste *t* de Student.

Os efeitos da desnutrição sobre a expressão da proteína GLUT3 no córtex cerebral de animais adultos foram avaliados em triplicatas de extratos protéicos para ambos os grupos. Os resultados mostram que a desnutrição causou uma redução significativa ($p < 0,01$, teste *t* de Student) da expressão do transportador GLUT3 no córtex cerebral total em relação aos animais controle (figura 4).

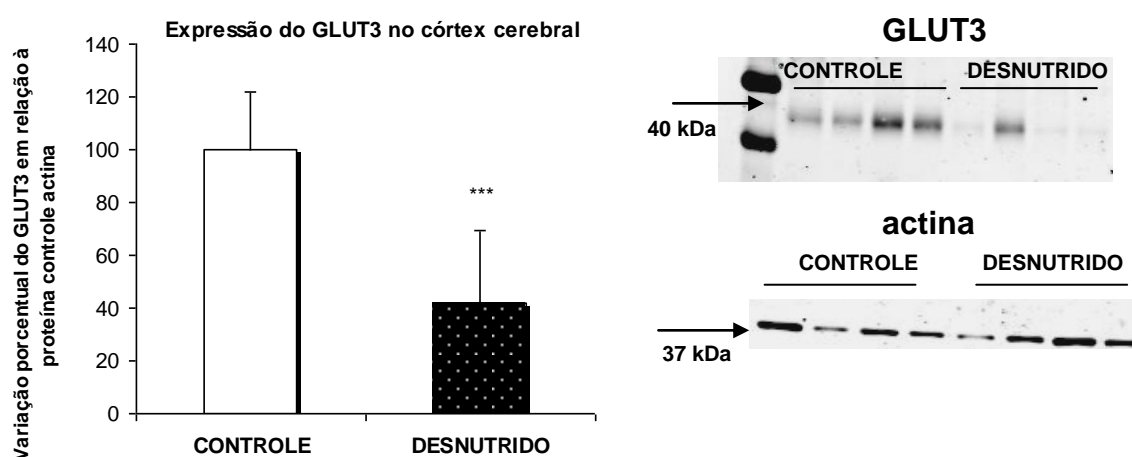


Figura 4- Expressão do transportador GLUT3 no córtex cerebral dos animais controle e desnutridos. As barras representam a variação percentual média da proteína GLUT3 em relação à proteína controle actina \pm o desvio padrão da média (n = 4 para os grupos controle e desnutrido). *** $P < 0,001$, teste *t* de Student.

Para a análise da atividade da acetilcolinesterase foi realizada inicialmente a dosagem de proteína nos três extratos de tecido cerebral preparados. Não houve diferença significativa no conteúdo de proteína entre os grupos experimentais, quando comparamos com os mesmos tipos de tratamento entre eles (figura 5).

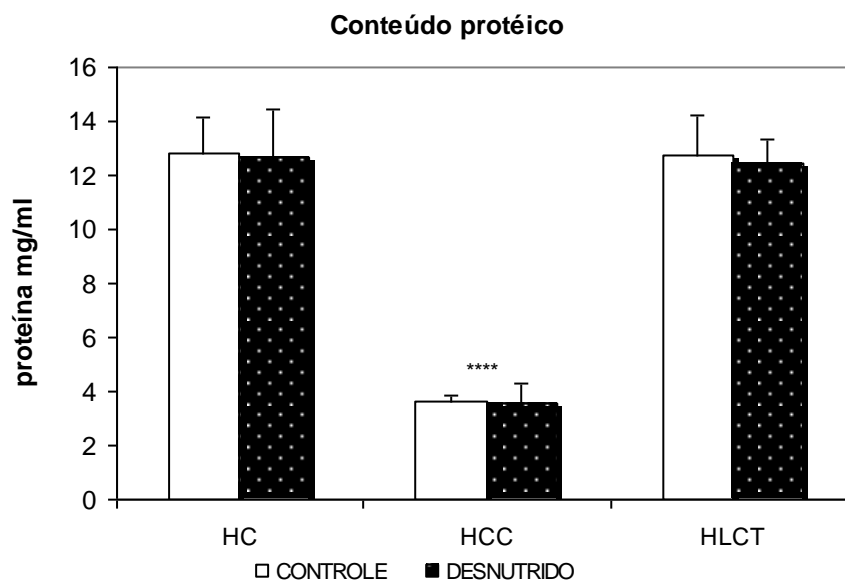


Figura 5 – Conteúdo em proteína (mg/ml) dos extratos de tecido cerebral nos animais controle (n=6) e desnutridos (n=7). As barras representam a quantidade média de proteína para cada tipo de extrato \pm o desvio padrão da média. **** $P < 0,0001$ teste *t* de Student, grupo HCC (homogenizado de células centrifugado) em relação aos tratamentos HC (homogenizado de células) e HLCT (homogenizado livre de células com triton).

Nos animais controle, o HC apresentou um conteúdo protéico de 12,83 mg/ml \pm 1,34, o HCC 3,65 mg/ml \pm 0,21, e o HLCT um resultado de 12,77 mg/ml \pm 1,44. Nos animais desnutridos, o HC apresentou um conteúdo protéico de 12,68 mg/ml \pm 1,74, o HCC 3,55 mg/ml \pm 0,75, e o HLCT um resultado de 12,42 mg/ml \pm 0,9 (figura 5). Contudo, observou-se uma diferença de conteúdo protéico entre o HCC e os demais tratamentos. Essa diferença se deve a não participação, no HCC, das proteínas celulares e ligadas à membrana celular.

A avaliação da atividade da acetilcolinesterase nos animais controle e desnutridos foi realizada de forma a expressar a atividade da enzima em U/ml e sua atividade específica em U/mg de proteína. A comparação das amostras foi feita correlacionando o tipo de extrato x a atividade da enzima (figuras 6 e 8) e

avaliando-se os efeitos do estado nutricional x a atividade da enzima (figuras 7 e 9).

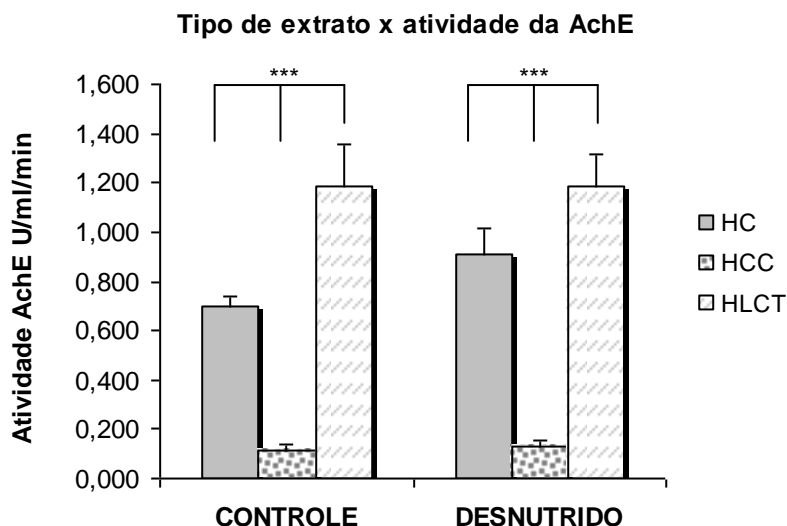


Figura 6 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) (U/ml) dos diferentes extratos de tecido cerebral nos animais controle (n=6) e desnutridos (n=7). As barras representam a atividade média da enzima para cada tipo de extrato \pm o desvio padrão da média. *** $P < 0,001$, ANOVA *one way*, teste de Tukey: grupo HC (homogenado de células) em relação aos tratamentos HCC (homogenado de células centrifugado) e HLCT (homogenado livre de células com triton); e grupo HCC em relação ao tratamento HLCT.

Nos animais controle, a atividade enzimática foi de: HC 0,696 U/ml \pm 0,111, o HCC 0,114 U/ml \pm 0,029, e o HLCT 1,186 U/ml \pm 0,130. Nos animais desnutridos, a atividade enzimática foi de: HC 0,906 U/ml \pm 0,044, o HCC 0,129 U/ml \pm 0,025, e o HLCT 1,186 U/ml \pm 0,165 (figura 6). A análise de variância *one-way* seguida do pós-teste de Tukey mostrou uma diferença significativa ($P < 0,001$) dos 3 diferentes tipos de extrato nos grupos controle e desnutrido. A atividade colinesterásica do extrato centrifugado (HCC) foi significativamente menor do que nos demais tratamentos, enquanto que no HLCT houve um significativo aumento, quando comparado aos demais. O aumento da atividade do HLCT deve-se ao fato de que as membranas estavam solubilizadas pelo uso do Triton 0,5%, aumentando a disponibilidade da AChE ligada a membrana.

A figura 7 mostra que houve diferença estatisticamente significativa na atividade do HC entre animais controle e desnutridos. Nestes últimos, um aumento significativo ($P < 0,001$, teste t de Student) foi constatado.

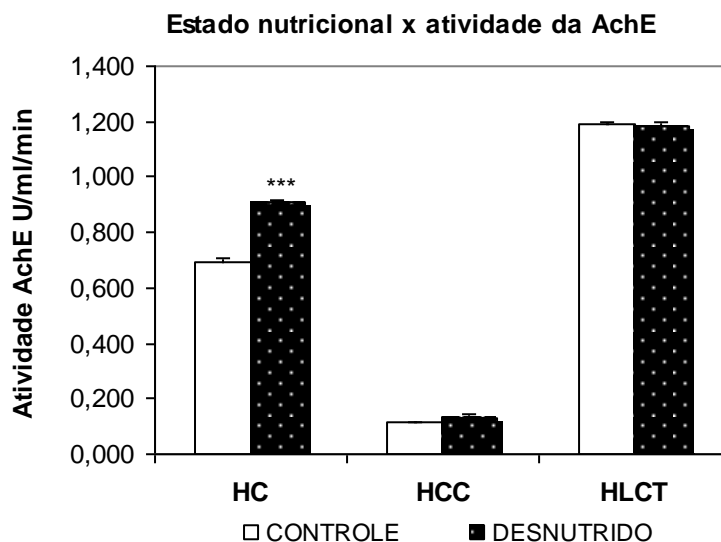


Figura 7 – Comparação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) (U/ml) nos animais controle (n=6) e desnutridos (n=7). As barras representam a atividade média da enzima para cada tipo de extrato \pm o desvio padrão da média. *** $P < 0,001$ teste t de Student, nos diferentes tipos de tratamento, grupo HC (homogenado de células), HCC (homogenado de células centrifugado) e HLCT (homogenado livre de células com triton).

A avaliação da atividade específica da enzima mostrou que nos animais controle, a atividade específica foi de: homogenado de células (HC), 0,061 U/mg de ptn \pm 0,016, o homogenado de células centrifugado (HCC), 0,033 U/mg de ptn \pm 0,003, e o homogenado livre de células com triton 0,5% (HLCT), 0,094 U/mg de ptn \pm 0,015. Nos animais desnutridos, a atividade específica da enzima foi de: homogenado de células (HC), 0,073 U/mg de ptn \pm 0,011, o homogenado de células centrifugado (HCC), 0,038 U/mg de ptn \pm 0,013, e o homogenado livre de células com triton 0,5% (HLCT), 0,092 U/mg de ptn \pm 0,010 (figura 8).

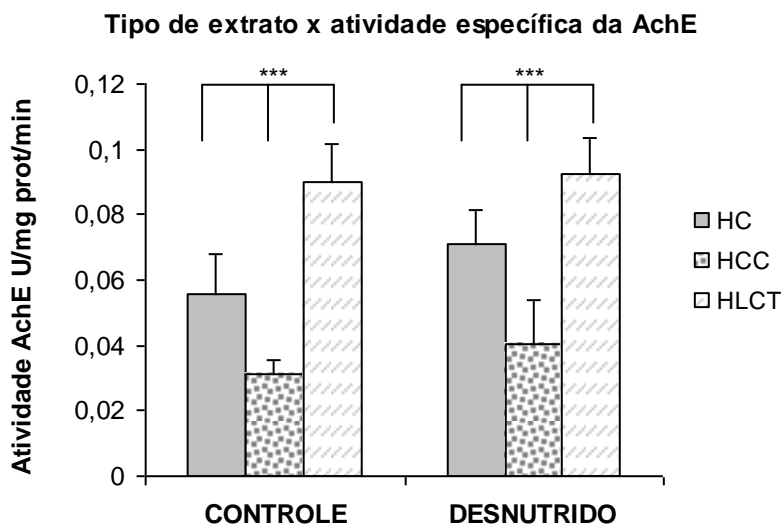


Figura 8 – Atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) (U/mg prot) dos diferentes extratos de tecido cerebral nos animais controle (n=6) e desnutridos (n=7). As barras representam a atividade média da enzima para cada tipo de extrato \pm o desvio padrão da média. *** $P < 0,001$, ANOVA *one way*, teste de Tukey: grupo HC (homogenado de células) em relação aos tratamentos HCC (homogenado de células centrifugado) e HLCT (homogenado livre de células com triton); e grupo HCC relação ao tratamento HLCT.

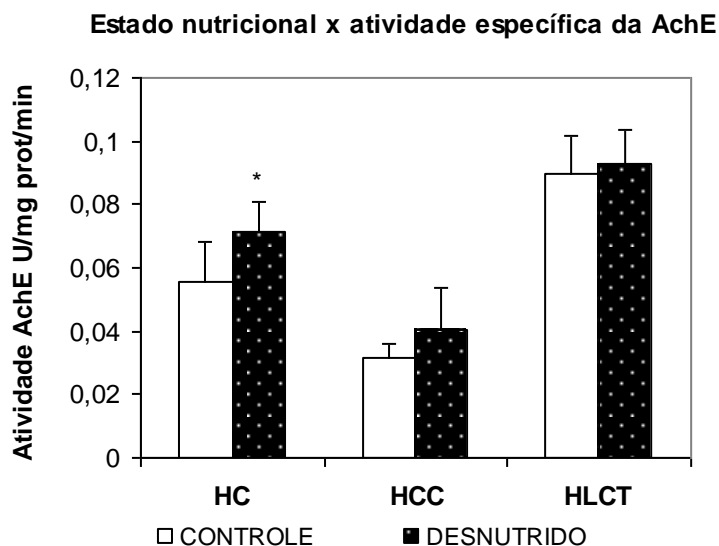


Figura 9 – Comparação da atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) (U/mg) nos animais controle (n=6) e desnutridos (n=7). As barras representam a atividade média da enzima para cada tipo de extrato \pm o desvio padrão da média. * $P < 0,05$ teste *t* de Student, grupo HC (homogenado de células) em relação aos tratamentos HCC (homogenado de células centrifugado) e HLCT (homogenado livre de células com triton).

A desnutrição causou um aumento significativo da atividade específica da AChE na fração do homogenado de células ($P < 0,05$, teste t de Student), em relação ao grupo controle.

Comparando-se os efeitos do tipo de extrato e do estado nutricional sobre a atividade da acetilcolinesterase, foi encontrada uma interação significativa ($P = 0,019$, ANOVA *two-way*, teste de Tukey) entre os dois fatores influenciando a atividade da enzima.

DISCUSSÃO

A desnutrição no início da vida pode repercutir sobre aspectos anatômicos e funcionais de diversos órgãos de forma duradoura na idade adulta (SÁEZ-VALERO *et al.*, 2003).

O tipo de procedimento técnico utilizado no nosso estudo para induzir desnutrição protéico-calórica, aumento do número de filhotes por ninhada, foi eficaz em reduzir o peso corporal dos animais até os 42 dias de vida. Após essa fase, observou-se a recuperação do peso corporal, que se manteve até o final do período do estudo quando os animais foram eutanasiados na 12^a semana. Com relação ao peso do encéfalo, observou-se que a restrição alimentar durante o período de amamentação induziu redução do peso do cérebro na idade adulta.

Nunes *et al.* (2002), ao estudar em ratos os efeitos da desnutrição precoce e da reabilitação nutricional sobre o limiar para crises convulsivas, demonstraram que não houve correlação entre a desnutrição seguida de reabilitação nutricional sobre o peso do encéfalo, apesar de ser discretamente maior nos animais controle. Contudo, o período de privação energética foi mais curto, quando comparado ao modelo utilizado no presente estudo, atingindo somente os primeiros 15 dias após o nascimento e, portanto, não compreendendo toda a fase de amamentação. Em outro estudo, Nunes *et al.* (2000) puderam observar uma redução do peso do encéfalo de animais desnutridos sem reabilitação. Animais amamentados de matrizes submetidas a diferentes graus de restrição protéica ou cuja oferta alimentar foi reduzida pelo aumento do tamanho da ninhada, também apresentaram redução do peso encefálico, quando comparados a animais controle (ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2004; MARIN *et al.*, 1995).

Ao confrontar esses resultados com os aqui apresentados, cuja restrição energética aconteceu durante todo o período de amamentação, sugere-se que a reabilitação nutricional tardia pode não ter efeito sobre modificações cerebrais que determinam a redução do peso do encéfalo, o que provavelmente acontece se essa reabilitação for iniciada ainda em fase de desenvolvimento crítico do encéfalo.

Em um estudo sobre as alterações vasculares e cerebrais de animais submetidos à desnutrição durante a vida fetal, demonstrou-se que a restrição protéica a qual as matrizes foram submetidas impactou na redução de peso corporal, peso do cérebro, cerebelo e na vascularização do cérebro ao

nascimento, porém só reduziu o conteúdo de proteína em regiões cerebrais se a desnutrição foi mantida até a idade adulta (BENNIS-TALEB *et al.*, 1999). Neste estudo, a recuperação nutricional após o nascimento mostrou-se eficaz em reverter a situação observada ao nascimento, com exceção da densidade de vasos sangüíneos analisados no córtex cerebral, que se manteve inferior na idade adulta, mesmo na administração de dieta controle. Isto demonstra que filhotes expostos a uma dieta hipoprotéica na fase de desenvolvimento fetal sofrem uma redução na vascularização cerebral, que se mantém ao longo da vida, podendo influenciar na oferta metabólica.

A desnutrição dos animais no presente estudo causou alterações na disponibilidade do principal substrato energético utilizado pelo cérebro: a glicose. Estudos demonstram que a desnutrição na vida intra-uterina e pós-natal causa resistência à ação da insulina (JAQUET *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2004; LOPES DA COSTA *et al.*, 2004), resultando em alterações nos níveis glicêmicos. Alguns autores relatam que a desnutrição precoce pós-natal leva à resistência à ação da insulina, resultando em níveis glicêmicos elevados, que persistem mesmo na vida adulta e caracterizam o estado diabético do tipo II (GAVETE *et al.*, 2005; GARCIA-SOUZA *et al.*, 2008). Em contrapartida, em estudo onde a desnutrição em ratos foi causada pelo consumo de dieta aprotéica pelas mães durante o período de lactação, os animais desnutridos apresentaram maior secreção de insulina induzida pela glicose do que aquela do grupo controle (LOPES DA COSTA *et al.*, 2004). Em outro estudo, que investigou os efeitos da desnutrição sobre a expressão do RNAm para insulina, mostrou que a desnutrição materna causava aumento dos níveis de RNAm da prole e, quando a desnutrição era prolongada até a idade adulta, uma redução nesses níveis era observada (MARTIN *et al.*, 2004).

Os estudos acima citados mostram que os efeitos da desnutrição sobre os níveis glicêmicos e secreção de insulina são variáveis de acordo com o período e a duração da restrição nutricional. Nos animais do presente estudo, a restrição nutricional durante o período de amamentação teve por efeito a redução dos níveis glicêmicos dos animais na vida adulta. Essa alteração poderia ser atribuída, em parte, a um possível efeito no aumento da secreção de insulina mediando a redução dos níveis glicêmicos dos animais, uma vez que a duração do período de

restrição nutricional foi de 21 dias. De acordo com os estudos de Martin *et al.* (2004), curtos episódios de desnutrição podem ocasionar aumento dos níveis de RNAm para insulina.

As repercussões do estado nutricional sobre o metabolismo cerebral e a ação de enzima da fenda sináptica foram avaliadas neste estudo através da expressão do principal transportador neuronal de glicose (GLUT3), assim como da atividade da enzima acetilcolinesterase.

A expressão do transportador neuronal de glicose GLUT3 presente na membrana celular, pode ser alterada por variações da glicemia (NAGAMATSU *et al.*, 1993; VANNUCCI *et al.*, 1997) bem como por modificações do aporte nutricional em ácido alfa-linolênico (XIMENES-DA-SILVA *et al.*, 2002). Durante a fase de amamentação, os níveis de GLUT3 no córtex cerebral de ratos começam a se elevar gradativamente e alcança seu pico concomitante com os processos de sinaptogênese (VANNUCCI & SIMPSON, 2003).

Os efeitos da restrição nutricional durante a fase de amamentação sobre a expressão do GLUT3 no córtex cerebral de ratos adultos foram pela primeira vez avaliados. Os resultados demonstraram que a restrição nutricional na fase de desenvolvimento crítico do encéfalo (em roedores, a fase de amamentação) reduziu a expressão do GLUT3 no córtex cerebral total.

Estudos sobre a expressão de transportadores de glicose em tecidos periféricos mostram que a desnutrição afeta tal expressão, em ratos neonatos, no músculo esquelético (AGOTE *et al.*, 2001; JAQUET *et al.*, 2001), no músculo cardíaco (GAVETE *et al.*, 2002), no tecido adiposo (GARCIA-SOUZA *et al.*, 2008), nas células beta do pâncreas (MARTIN *et al.*, 2004) e em hepatócitos (LOPES DA COSTA *et al.*, 2004). O GLUT4, principal transportador de glicose do músculo esquelético e cardíaco e do tecido adiposo, é uma proteína cuja função é regulável pela ação da insulina (CARRUTHERS, 1990). Jaquet *et al.* (2004) mostraram que a desnutrição em ratos durante a vida intra-uterina causava uma redução do RNAm para o GLUT4 nos músculos cardíaco e esquelético, fato esse também constatado por Gavete *et al.* (2002), enquanto Gavete *et al.* (2005) relatam que no músculo esquelético não haveria alteração da proteína GLUT4, mas um aumento da translocação desse transportador, estimulado pela insulina. Lopes da Costa *et al.* (2004) relatam em animais desnutridos, durante a fase de

amamentação, um aumento da expressão do GLUT2 nos hepatócitos e células beta pancreáticas.

A importante redução do GLUT3 no córtex cerebral dos animais desnutridos neste estudo poderia ser explicada, em parte, pela diminuição da glicemia devido a um menor peso do cérebro desses animais em relação ao grupo controle. Esses fatores poderiam induzir um menor aporte direto de glicose para os neurônios e, assim, uma menor expressão do GLUT3. De outra parte não se pode excluir a participação de outros transportadores de glicose, como o GLUT1, na barreira hemato-encefálica e nos astrócitos como importantes carreadores da glicose para o parênquima cerebral e para o metabolismo cerebral, em geral. De fato, segundo os estudos de Pellerin & Magistretti (1994, 2004), durante a ativação cerebral o fluxo de captura de glicose pelas células nervosas é direcionado principalmente para a captação de glicose pelos astrócitos. Em seguida, a glicose será metabolizada à lactato, que será transportado pelos transportadores MCT1 e MCT2, respectivamente, dos astrócitos aos neurônios, onde será convertido em piruvato, gerando energia para os neurônios através da fosforilação oxidativa.

A atividade da acetilcolinesterase na fenda sináptica, foi avaliada para se investigar se a desnutrição protéico-calórica durante a amamentação poderia alterar funções metabólicas outras, além do metabolismo energético cerebral.

Diante dos resultados obtidos com os animais controle, pode-se observar que a atividade do extrato onde houve aumento da disponibilidade da enzima ligada a membrana (HLCT), foi significativamente maior quando comparada as frações solúveis (HCC). Sugerindo uma contribuição mais relevante da fração ligada a membrana, sobre a degradação da acetilcolina, em mamíferos. Condição também observada em estudos sobre a distribuição molecular da AChE no córtex cerebral (SÁEZ-VALERO *et al.*, 2003).

Estados isquêmicos podem promover mudanças na atividade da AChE, especialmente a redução da atividade da isoforma G1, como um possível mecanismo protetor contra o dano isquêmico, preservando a microcirculação cerebral e a oferta energética ao tecido, devido ao relaxamento vascular induzido pela acetilcolina. As isoformas G4 (fração ligada à membrana) e G2, por sua vez, não apresentaram modificações (SÁEZ-VALERO *et al.*, 2003).

No presente estudo, a atividade do extrato HLCT (maior disponibilidade da fração ligada à membrana) não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e desnutrido, situação que se assemelha a modificações da atividade em estados isquêmicos.

As fibras colinérgicas centrais exercem papel importante na aquisição e consolidação da memória (DAS *et al.*, 2005). O uso de anticolinérgicos vem sendo associado a perturbações de comportamento e redução de processos cognitivos e de atenção (FIBIGER, 1990). Por outro lado, o uso de anticolinesterásicos, fármacos que reduzem a atividade da AChE em pacientes com doenças neurodegenerativas relacionadas a neurônios colinérgicos, tem apresentado sucesso na melhoria do quadro patológico (DECKER *et al.*, 2006), por reduzir a hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica (DAS *et al.*, 2005).

Vários tipos de estresse podem ser responsáveis por mudanças na atividade da AChE (DAS *et al.*, 2005); neste sentido, algumas pesquisas vêm sendo realizadas para identificar qual a relação destas alterações com as funções de aprendizado e memória.

Pacientes com doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, apresentam aumento dos níveis e da atividade de AChE em torno das placas amilóides, que contribui para a deposição do peptídeo beta-amilóide, envolvido no dano neuronal (AMICI *et al.*, 2001), especialmente no que diz respeito ao aumento da atividade da isoforma G1 (SÁEZ-VALERO *et al.*, 2002). Mudanças ocorridas na atividade de ambas as isoformas da AChE na região do hipocampo estão relacionadas com deficits cognitivos (DAS *et al.*, 2005).

Apesar da atividade da enzima no HCC e HLCT não apresentar diferença significativa entre os grupos experimentais, a intervenção dietética e o tipo de extrato influenciou na atividade da AChE, de forma que, os animais desnutridos apresentaram uma atividade significativamente maior quando comparados aos animais controle, conforme demonstrado pela análise de variância de duas vias.

A expressão da AChE pode ser regulada pela concentração intracelular de cálcio; assim, a estimulação de canais lentos de cálcio, perturbando a homeostase do cálcio, vem sendo relacionada ao aumento da expressão gênica da AChE em camundongos (DAS *et al.*, 2005).

Da mesma forma que a deposição amilóide é responsável pela estimulação de canais lentos de cálcio, contribuindo para o aumento da atividade da AChE (DAS *et al.*, 2005), modificações na neurotransmissão em animais desnutridos, especialmente relacionadas à redução da captação de glutamato pelos astrócitos, podem estar relacionadas a alterações na homeostase do cálcio intracelular (FEOLI *et al.*, 2006).

Na desnutrição, o aumento das concentrações de glutamato na fenda sináptica, devido à redução da captação pelos astrócitos, promove uma estimulação exarcebada de receptores do tipo NMDA em neurônios, relacionada com lesões neuronais, devido ao aumento do influxo de cálcio (BEART & O'SHEA, 2007).

Em resumo, a desnutrição no início da vida pode trazer conseqüências a longo prazo sobre o tecido cerebral, relacionadas à diminuição da expressão do principal transportador de glicose para os neurônios e ao aumento da atividade colinesterásica que juntos, poderiam contribuir para déficits das funções cognitivas.

CONCLUSÕES

A desnutrição, quando ocorre no período de desenvolvimento crítico do encéfalo, leva a alterações estruturais e metabólicas observadas na vida adulta, mesmo após a reabilitação nutricional.

No presente estudo, a restrição nutricional determinada pelo aumento do número de filhotes para cada mãe durante os 21 dias do período de amamentação, resultou em redução significativa do peso do cérebro, diminuição dos níveis glicêmicos, diminuição do transportador de glicose GLUT3 no córtex cerebral e um aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase. O peso corporal dos animais foi reduzido durante as 4 primeiras semanas de vida pós-natal, mas, em seguida, igualou-se àquele do grupo controle. O breve período de desnutrição que ocorreu durante a fase de desenvolvimento crítico do encéfalo foi suficiente para alterar parâmetros importantes para a funcionalidade do cérebro, como demonstrado pela significativa redução do GLUT3 e do aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase.

Esses resultados corroboram e acrescentam dados acerca dos efeitos da desnutrição sobre o desenvolvimento e funcionalidade do sistema nervoso. Pela primeira vez, um estudo demonstrou que a desnutrição precoce, de curta duração, altera a expressão do principal transportador de glicose neuronal. Juntamente com a redução do GLUT3, o aumento da atividade da acetilcolinesterase indicam que o estado nutricional pode ser fator determinante no aparecimento ou desenvolvimento de déficits cognitivos, que estão estritamente associados a atividade metabólica cerebral.

Os resultados do estudo enfatizam a necessidade de se intervir rapidamente na recuperação nutricional evitando que a desnutrição se instale e perdure, principalmente se a mesma ocorre durante períodos importantes para o crescimento e desenvolvimento do cérebro.

REFERÊNCIAS

Agote M, Goya L, Ramos S, Alvarez C, Gavete ML, Pascual-Leone AM, Escrivá F. Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 281:1101-1109.

Amici, S; Lanari, A; Romani, R; Antognelli, C; Gallai, V; Parnetti, L. Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase activity after long-term treatment with donepezil and rivastigmina. *Mechanisms of Ageing and Development* 122 (2001) 2057–2062

Andrade ADF, Guedes RCA, Teodósio NR. Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. *Braz J Med Biol Res* 1990; 23: 8889-8893

Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4155–4160.

Beart, PM; O'Shea, RD. Transporters for L-glutamate: An update on their molecular pharmacology and pathological involvement *British Journal of Pharmacology* 2007; 150, 5–17

Benítez-Bribiesca, L; Rosa-Alvarez, ID; Mansilla-Olivares, A. Dendritic Spine Pathology in Infants With Severe Protein-Calorie Malnutrition *Pediatrics*, 1999. vol2. 104

Bennis-Taleb, N; Remacle, C; Hoet, JJ; Reusens, B. A Low-Protein Isocaloric Diet During Gestation Affects Brain Development and Alters Permanently Cerebral Cortex Blood Vessels in Rat Offspring. *American Society for Nutritional Sciences* 1999, 0022-3166

Blokland, A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Research Reviews* 1996, 21: 285-300

Bondy C. A., Lee W. and Zhou J. Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression. *Mol. Cell. Neurosci* 1992. 3, 305–314.

Carruthers, A. Facilitated diffusion of glucose. *Physiological review*. 1990; 4: 1135-1176.

Cheng, CM; Kelley, B; Wang, J; Strauss, D; Eagles, DA; Bondy, CA. A Ketogenic Diet Increases Brain Insulin-Like Growth Factor Receptor and Glucose Transporter Gene Expression *Endocrinology* 2003, 144(6):2676–2682

Costa-Cruz RR, Amâncio-dos-Santos A, Guedes, RC. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neurosci Lett*. 2006 Jul 3;401(3):271-5

Coupain, JG; Tyzbit, RS; Beecher, AR. Influence of Altering Dietary Protein Levels during Early Development of the Rat on the Activity of Several Brain Enzymes *J. Nutr.* 107: 1102-1113, 1977.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 1–105

Das, A; Dikshit, M; Nath, C. Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 81 2005, 89–99

Decker, M; Krauth, F; Lehmann, J. Novel tricyclic quinazolinimines and related tetracyclic nitrogen bridgehead compounds as cholinesterase inhibitors with selectivity towards butyrylcholinesterase *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006; 1966–1977

Dobbing J. Vulnerable periods in devolving brain. In: Davison NA, Dobbing J, editors. *Applied neurochemistry*. Oxford: Blackwell; 1968. p. 287-316.

Ellman, G.L.; Courtney K.D; Andres, V. and Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, v.7, p.88-95, 1961.

Feoli, A M.; Siqueira, I.; Almeida, LMV.; Tramontina, A Ca.; Battu, C.; Wofchuk, ST.; Gottfried, C.; Perry, ML.; Gonçalves, CA. Brain Glutathione Content and Glutamate Uptake Are Reduced in Rats Exposed to Pre- and Postnatal Protein Malnutrition. *The Journal of Nutrition*, 2006, 0022-3166

Fibiger HC. Central cholinergic systems and memory. In: Squire LR, Lindenlaub E, editors. *The biology of memory*. Symposia Medica Hoechst, vol. 23. New York: Springer-Verlag; 1990.

Florêncio TM, Ferreira HS, França AP, Cavalcante JC, Sawaya AL. Obesity and undernutrition in a very-low-income population in the city of Maceió, northeastern Brazil. *Br J Nutr*. 2001 Aug; 86(2):277-84

Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci*. 1997;17:8363–75.

Fuller, GN; Wiggins RC. Differential growth recovery within the brains of postnatally undernourished rats. *Dev Brain Res*, 1984, 15: 280-4.

Gallagher, E. A. L., Newman, J. P., Green, L. R., Hanson M. A. The effect of low protein diet in pregnancy on the development of brain metabolism in rat offspring. *J Physiol* 2005; 553–558

Garcia-Souza EP, da Silva SV, Félix GB, Rodrigues AL, de Freitas MS, Moura AS, Barja-Fidalgo C. Maternal protein restriction during early lactation induces GLUT4 translocation and mTOR/Akt activation in adipocytes of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Sep;295(3):E626-36. 2008

Gavete ML, Agote M, Martin MA, Alvarez C, Escriva F. Effects of Chronic Undernutrition on Glucose Uptake and Glucose Transporter Proteins in Rat Heart. *Endocrinology* 2002, 143(11):4295–4303

Gavete, M. L., Martín, M. A., Alvarez, C., Escriva, F. Maternal Food Restriction Enhances Insulin-Induced GLUT-4 Translocation and Insulin Signaling Pathway in Skeletal Muscle from Suckling Rats, *Endocrinology*, 2005, 146(8):3368–3378

Harik S. I., Kalaria R. N., Anderson L., Lundal P. and Perry G. Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: Abundance in tissues with barrier functions. *J. Neurosci.* 1990, 10, 3862–3872.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Perfil estatístico de crianças e mães no Brasil: aspectos de saúde e nutrição, Rio de Janeiro, 1992; 130.

Jaquet D, Vidal H, Hankard R, Czernichow P, Levy-Marchal C. Impaired regulation of glucose transporter 4 gene expression in insulin resistance associated with in utero undernutrition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jul;86(7):3266-71.

Kanai Y, Hediger MA. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch* 2004, 447: 469–479.

Kar, BR; Rao, SL; Chandramouli, BA. Cognitive development in children with chronic protein energy malnutrition. *Behavioral and Brain Functions* 2008, 4:31

Keller, EA.; Cuadra, GR.; Molina VA.; Orsincher, OA. Perinatal Undernutrition Affects Brain Modulatory Capacity of β -Adrenergic Receptors in Adult Rats. *American Institute of Nutrition*, 1990, 0022-3166

Krigman M, Hogan E. Undernutrition in the developing rat: Effect upon myelination. *Brain Res*, 1976, 107: 239-255

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-5

Laming PR, Kimelberg H, Robinson S, Salm A, Hawrylak N, Muller C, Roots B and Ng K. Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neurosci and Behav*, 2000, 24:295-340

Leão AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophys*, 1944, 7:359-390.

Lopes Da Costa, C; Sampaio De Freitas, M; Sanchez Moura, A. Insulin secretion and GLUT-2 expression in undernourished neonate rats. *J Nutr Biochem*. 2004 Apr;15(4):236-41.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *J. Biol. Chem*. 1951, 193, 265

Marin, MC; Tomás, ME, Serres, C; Mercury, O. Protein-Energy Malnutrition during Gestation and Lactation in Rats Affects Growth Rate, Brain Development and Essential Fatty Acid Metabolism. *American Institute of Nutrition*, 1995, 0022-3166

Martín MA, Fernández E, Pascual-Leone AM, Escrivá F, Alvarez C. Protein calorie restriction has opposite effects on glucose metabolism and insulin gene expression in fetal and adult rat endocrine pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Apr;286(4):E542-50. 2003.

Morgane PJ, Miller M, Kemp, T, Stern N, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz E, Resnick. O The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosc Biobehav Rev*, 1978, 2: 137-230

Nagamatsu S., Kornhauser JM., Burant CF, Seino S., Mayo KE. And Bell G. Glucose transporter expression in brain. CDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem* 1992, 267(1):467-472

Nagamatsu S., Sawa H., Kamada K., Nakamichi Y., Yoshimoto K. and Hoshino T. Neuron-specific glucose transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat

glucose transporter (RGT3) in rat central neurons. *FEBS Lett* 1993, . 334, 289–295.

Nunes ML, Liptáková S, Velísková J, Sperber EF, Moshé SL. Malnutrition increases dentate granule cell proliferation in immature rats after status epilepticus. *Epilepsia* 2000; 41(suppl.6): S48-S52.

Nunes, ML; Batista, BB; Micheli, F; Batistella, V. Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats. *J Pediatr* 2002; 78 (1): 39-44:

O'Shea RD. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002, 29: 1018–1023.

Palencia G, Calvillo M, Sotelo J. Chronic malnutrition caused by a corn-based diet lowers the threshold for pentylenetetrazoleinduced seizures in rats. *Epilepsia* 1996; 37: 583-86.

Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(22): 10625-9.

Pellerin. L., Pellegrini, G., Martin, J.L., Magistretti, P.J. Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 31;95(7):3990-5 (1998).

Pellerin L, Magistretti PJ. Neuroenergetics: Calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *The Neuroscientist*, 2004, 10(1): 53-62.

Pierre, K. and Pellerin, L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J. Neurochem.* 94(1):1-14 (2005).

Pifferi, F; Roux, F; Langelier, B; Alessandri, JM; Vancassel, S; Jouin, M; Laviaille, M; Guesnet, P. (n-3) Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency Reduces the

Expression of Both Isoforms of the Brain Glucose Transporter GLUT1 in Rats
American Society for Nutritional Sciences, 2005. 2241-2246

Pow DV, Barnett NL. Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neurosci Lett* 2000, 280: 21–24.

Rocha-de-Melo AP, Guedes RCA Spreading depression is facilitated in adults rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. *Brazilian J Med Biol Res*, 1997, 30: 663-669

Rocha-de-Melo, A.P., Picanço-Diniz, C.W., Borba, J.M.C., Santos-Monteiro, J., Guedes, R.C.A.,. NADPH-diaphorase histochemical labeling patterns in the hippocampal neuropil and visual cortical neurons in weaned rats reared during lactation on different litter sizes. *Nutr. Neurosci.* 2004, 7, 207–216.

Romani SAM, Lira PIC. Fatores determinantes do crescimento infantil. *Rev Brás Saúde Matern Infant* 2002, 4(1): 15-23

Sáez-Valero, J; González-García, C; Cenã, V. Acetylcholinesterase activity and molecular isoform distribution are altered after focal cerebral ischemia. *Molecular Brain Research* 117 (2003) 240–244

Sáez-Valero, J; Ceballos, ML; Small, DH, Felipe, C. Changes in molecular isoform distribution of acetylcholinesterase in rat cortex and cerebrospinal fluid after intracerebroventricular administration of amyloid b-peptide *Neuroscience Letters* 325 (2002) 199–202

Schurr, A; Miller, JJ; Payne, RS and Rigor, BM. An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the needs of glutamate activated neurons. *J Neurosci* 1999, 19(1): 34-39

Scrimshaw NS, Gordon JE. Malnutrition, learning and behaviour. MIT Press, Cambridge/MA, 1968, 566.

Soares NT, Guimarães ARP, Sampaio HAC, Almeida PC, Coelho RR () Estado nutricional de lactentes em áreas periféricas de fortaleza. Rev. Nutr., Campinas, 2000; 13(2): 99-106.

Stern WC, Miller M, Forbes WB, Morgane PJ, Resnick O. Ontogeny of the levels of biogenic amines in various part of the brain and in the peripheral tissues in normal and protein malnourished rats. Exp Neurol, 1975, 49: 314-326.

Thadeu, RC. Farmacologia do Sistema Nervoso Central. In: Farmacologia Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2º Ed. 1998.

Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, Guedes RC. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model for experimental malnutrition. Arch Latinoam Nutr. 1990 Dec; 40(4):533-47

Torun, B; Chew, F. Desnutrição energético-protéica. In: Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença. Ed. Manole: 9ª Ed. 2003, 1029-1055

Tsacopoulos M and Magistretti PJ. Metabolic coupling between glia and neurons. J Neurosci 1996, 16(3): 877-885

Vannucci SJ, Seaman LB and Vannucci RC. Glucose transporters proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. Glia 1997, 21: 2-21

Vannucci SJ. Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. J Neurochem 1994, 62: 240-246.

Vannucci, SJ.; Simpson, IA. Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003, 285:1127-1134

Viana, G. S. B. ; Figueiredo, R. M. O. ; Bruno, J. A. Effects of protein-energy malnutrition on muscarinic receptor density and acetylcholinesterase activity in rat brain, Annals of Nutrition & Metabolism, v. 41, n. 1, p. 52-59, 1997.

Villescas, R; Ostwald, R; Morimoto, H; Bennett, AL. Behavior and biochemical brain parameters in rats. *The Journal of Nutrition*, 1980, 1103-1110

Ximenes-da-Silva A, Guedes RCA. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. *Brazilian J Med Biol Res*, 1991, 24: 1277-1281

Ximenes-da-Silva A, Lavalie F, Gendrot G, Guesnet P, Alessandri JM, Lavalie M. Glucose transport and utilization are altered in the brain of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Neurochemistry*, 2002, 81, 1328–1337

Walz W and Mukerji S. Lactate release from cultured astrocytes and neurons: a comparison. *Glia* 1988,1:366-70

Wilson, DA; Fletcher, ML, Sullivan, RM. Acetylcholine and Olfactory Perceptual Learning *Learn. Mem.* 2004 11: 28-34

Wong-Riley M. T. T. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci.* 1989, 12, 94–101.

Yucel, F.; Warren, M. A.; Gumusburun, E. The effects of undernutrition on connectivity in the cerebellar cortex of adult rats. *J. Anat.* 1994, 184, pp. 59-64

Apêndice

Vasconcelos V. S¹.; Machado S. S.².; Guedes R. C. A³.; Bandeira B. C¹. and Ximenes, A. S¹. Early postnatal malnutrition, expression of GLUT3 and acetylcholinesterase activity in the brain of young adult rats.

Title: Early postnatal malnutrition, expression of GLUT3 and acetylcholinesterase activity in the brain of young adult rats.

Vivian Sarmiento de Vasconcelos¹.; Sônia Salgueiro Machado²; Rubem Carlos Araújo Guedes³.; Bruno Carneiro Bandeira¹ and Adriana Ximenes-da-Silva^{1a}.

¹Laboratório de Eletrofisiologia e Metabolismo Cerebral. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. ²Instituto de Química e Biotecnologia. Universidade Federal de Alagoas, 57010020, Maceió, ³ Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife, Brazil.

^a Corresponding author:

Dr Adriana Ximenes-da-Silva

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

Prado - Maceió - AL- Brazil

CEP: 57010-020

Phone: + 55 82 32235613

Fax: +55 82 32212501

e-mail: adrianaxis@yahoo.com.br

Abstract

Effects of malnutrition in the brain are more pronounced during the period of growth spurt, corresponding to the suckling in rodents. Neuronal glucose transporter GLUT3 expression and acetylcholinesterase (AChE) activity were studied in the brain of adult young rats (84 days old) suckled in litters formed by 6 (control group) or 12 pups (malnourished group). In the adult rats, brain weight, blood glucose levels and GLUT3 expression were decreased in malnourished group ($P < 0.001$, Student's *t* test) compared to the control one. Increased activity of acetylcholinesterase was found in cerebral cortex homogenates and a significant interaction ($P = 0.019$, ANOVA *two-way*, Tukey's test) was found between nutritional state and homogenate fraction. In summary, malnutrition during suckling period decreased GLUT3 expression and increased AChE activity in the rat brain that could contribute to possible cognitive deficits and changes of brain metabolic activity.

Keywords

malnutrition; glucose transporter; GLUT3; acetylcholinesterase; brain metabolism.

Introduction

Several studies report the effects of malnutrition on the central nervous system (CNS) reducing brain weight (Coupain *et al.*, 1977; Shambaugh *et al.*, 1986), modifying neurotransmitter systems (Villescas *et al.*, 1980, Keller *et al.*, 1990, Aid *et al.*, 2003), inducing morphological changes of neurons (Benitez-Bribiesca *et al.*, 1999) and changing the brain ability to modify spreading depression velocity of propagation in response to variations on blood glucose levels (Ximenes-da-Silva & Guedes, 1991). These effects are more severe if the malnutrition is long-termed or if it occurs during the “brain growth spurt” which corresponds to the highest rate of neurogenesis during development. In rats this period corresponds to 21 days of postnatal life that is during suckling (Scrimshaw & Gordon, 1968).

Among the experimental models to induce malnutrition, the increase of litter size during suckling was successfully used by Rocha-de-Melo *et al.* (2004, 2006). These authors observed that malnutrition caused by the reduction in food intake due to competition among pups of large litters led to reduce body and brain weight besides changes of cortical spreading depression velocity of propagation in the cerebral cortex of these animals.

Effects of short- and long-term malnutrition on the CNS development, even after nutritional recovery with balanced diet, evidenced changes of energy metabolism in the adulthood with reduced expression of glucose transporters in cardiac and skeletal muscle (Gavete *et al.*, 2002; Agote *et al.*, 2001) and increased activity of acetylcholinesterase (AChE) in regions like the cerebellum, striatum and hypothalamus (Villescas *et al.*, 1980).

Acetylcholine is a major neurotransmitter of the nervous system, associated with the maintenance of processes of learning and memory (Blokland, 1996, Warburton *et al.*, 2003, Wilson *et al.*, 2004) and the control of cerebral blood flow (Sáez-Valero *et al.*, 2003).

The decrease in cholinergic activity and increased activity of fractions of AChE has been associated with states of dementia in elderly patients and the loss of cognitive function in patients with Alzheimer's disease (Blokland, 1996). Malnutrition can also lead to a reduction in density of muscarinic receptors in brain regions, such as motor and somatosensory cortex in rats submitted to protein-energy restriction (Viana *et al.*, 1997).

In the CNS, the astrocytes have an important role in the metabolism of glucose (Pellerin & Magistretti, 2004), particularly during brain activation. Glutamate released in synaptic cleft is recaptured by astrocytes leading to an increased need of ATP to restore ionic gradient in these cells. Then glucose will be primary uptaken by astrocytes and metabolized through glycolitic pathway to supply neurons with lactate which is converted to piruvate to furnish intermediates to tricarboxilic acid cycle to produce energy. In malnourished rats it was demonstrated an increased glutamate concentration on synaptic clefts that will stimulate oxidative stress and excitotoxicity in brain cells of these animals (Feoli *et al.*, 2006).

In the first two weeks of postnatal life the levels of glucose transporters, GLUT1 and GLUT3 in the rat brain are low but increase significantly with brain maturation and synaptogenesis (Vannucci, 1994). Therefore, malnutrition occurring in this period could change brain glucose transporters expression and in consequence glucose metabolism.

Neuronal glucose transporter and acetylcholinesterase activity in brain of malnourished rats from large litters has not been studied yet. Thus, this study aims to investigate if malnutrition during the critical development of the CNS changes the expression of the main glucose transporter in neurons, GLUT3 and, if the effects of malnutrition in early life could also affect acetylcholinesterase activity in brain of adult rats.

Methods

The experiments were conducted in accordance with protocols established in the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH) and with the norms of the Ethics Committee for Animal Research, of the Universidade Federal de Alagoas. Wistar rats were kept in an environmentally controlled room at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ with a 12:12h light/dark cycle (lights on at 06:00h).

Male Wistar rats from dams fed with a commercial rat chow diet containing 22% of protein (Labina®) were randomly distributed, at birth, to form litters of two different sizes: medium, composed by 6 and large by 12 pups. After weaning (at postnatal day 21), pups were housed 4–5 per cage and fed with the same maternal lab chow diet until 12 weeks-old when experiments were performed. Animals from medium litters constituted control ($n = 20$) and that from large ($n = 26$) undernourished group. The body weights were determined weekly until the day of experimental procedures.

Tissue preparations and assays

In the adulthood animals were fasted for 12 hours and blood glucose levels were measured collecting a drop of blood from the tail using a glucometer (Prestige IQ®). After, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50mg/kg body weight) and sacrificed by decapitation. The brain and cerebellum were quickly removed, weighed, frozen in isopentane -70°C and after stored at -20°C to AChE activity determination and GLUT3 expression studies, except when measures were immediately proceeded.

The right hemisphere of 6 control and 7 undernourished animals were used for analysis of activity of acetylcholinesterase and determination of protein by a colorimetric method (Lowry *et al.*, 1951). The tissue was homogenized in 0.9%NaCl (pH 7.4) solution

and mechanically disrupted using a Polytron® homogenizer. The homogenates were adjusted to a final concentration of 80 mg of brain tissue/ml of 0.9%NaCl buffer.

Tissue homogenate was divided into three samples: homogenate of cells (HC) which was not processed with any treatment until the dosage; homogenate centrifuged of cells (HCC, centrifuged at 12,000 rpm, 4 °C for 10 min) and homogenate free of cells with triton-HLCT where samples were homogenized by mechanical disruption in a buffer containing 0.5% Triton X-100. The samples were immediately subjected to the assays described below.

Specific dilutions of homogenates were used for AChE activity: the HC was diluted in a proportion of 1:100; the extract centrifuged HCC 1:50 and cell-free extract with 0.5% triton - HLCT 1:100 dilution. AChE activity was determined spectrophotometrically according to the method of Ellman *et al.* (1961) at 412 nm. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of AChE catalyzing the hydrolyze of 1 µmoles of substrate per minute under assay conditions. AChE activity was expressed in U/ml and the specific activity of AChE in U/mg protein. Protein was measured according to Lowry *et al.* (1951).

Glucose transporter GLUT3 expression

The glucose transporter GLUT3 expression was assayed in the left cerebral cortex of 4 animals for each group by Western blotting. Briefly, cerebral cortex of each animal was dissected and homogenized by mechanical processing in a buffer containing 40 mM Tris-HCl (pH 7.4), 250 mM sucrose, 5 mM dithiothreitol, 2 mM EGTA, 2 µg/ml protease inhibitors cocktail (Sigma). The homogenate was centrifuged at 1,000 g for 10 min, supernatant was recovered, diluted in the same buffer and then centrifuged at 16,000 g for

10 min at 4 ° C. Pellets were diluted in Tris-HCl buffer and protein dosage was proceeded using BCA kit essay.

Samples of protein (25 µg) in triplicate were diluted in electrophoresis gel to 10% SDS-PAGE according to the method of Laemmli (1970). The proteins were transferred by electrophoresis in Tris-glycine, pH 7.4 buffer (30 V at 4 ° C, overnight) to nitrocellulose membranes (BioRad) and the sites of non-specific binding was blocked in a solution containing 1% BSA (bovine serum albumin) + 10% skim milk (Sigma) at room temperature for 1 hour. Then, the membranes were incubated with primary antibodies anti-GLUT3 (1:1500, Millipore) and anti-beta actin (1:5000) diluted in 0.1% PBST + 1% skim milk and incubated at 4 ° C overnight. After rinsing in PBST the membranes were incubated with fluorescent secondary antibodies anti-goat IRDye (1:5000) and anti-mouse Alexa Fluo (1:5000) (LI-COR) diluted in PBST + 1% milk powder for 2 hours at room temperature. The detection and quantification of the signal was performed by the Odyssey® infrared detection system (LI-COR).

Statistics

Data of body weight, blood glucose levels, protein quantification and activity of acetylcholinesterase were evaluated using the Student's *t* test. Analysis of variance of one or two ways followed by Tukey's test was also used for activity assays.

Results

The larger number of pups per litter to induce protein-energy malnutrition caused significant reduction compared to the control group in body weight of malnourished animals beginning at weaning until 3 weeks after this time (Figure 1).

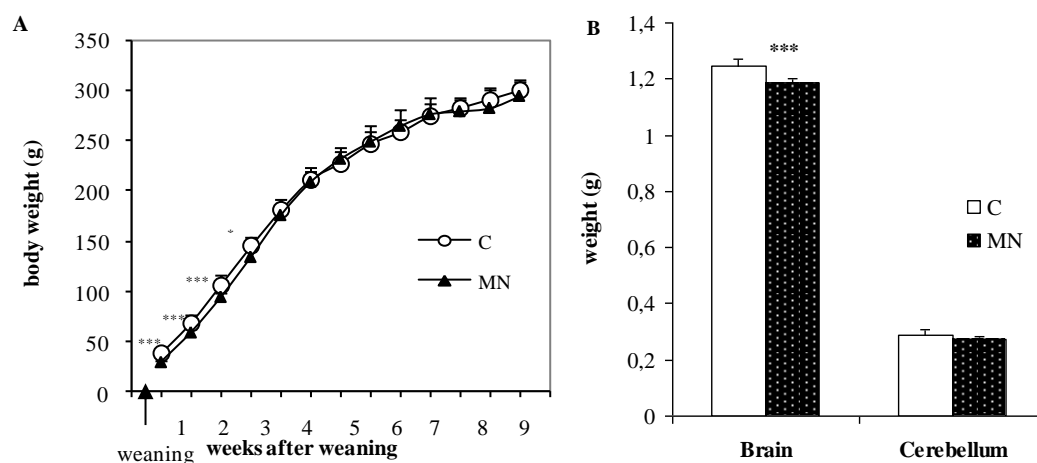


Figure 1 - **A**, Body weights of rats suckled in litters of medium (C, $n=20$) and large-size litters (MN, $n=26$), composed by 6 and 12 pups. **B**, brain weight of adult control ($n=10$) and malnourished ($n=9$) rats. Data are expressed as mean \pm standard deviation, with the number of animals in parenthesis. *** $P < 0.01$, $P < 0.05$; Student's t test.

Body weight in this period was: weaning, 37.05 ± 3.86 control, 29.27 ± 1.65 , malnourished $P < 0.001$; week 1, 67.65 ± 8.18 control, 58.81 ± 4.02 , malnourished $P < 0.001$; week 2, 105.40 ± 10.45 control, 94.08 ± 4.53 , malnourished $P < 0.001$; week 3, 143.70 ± 11.33 control, 133.81 ± 6.45 malnourished, $P < 0.05$, Student's t test. From forth week after weaning until adult life there were no difference in body weight of malnourished rats compared to control group. The weight of the brain showed a significant (1.186 ± 0.016) difference when compared with the control animals (1.245 ± 0.025) $P < 0.001$. However, the weight of the cerebellum showed no significant difference (Figure 1).

Blood glucose levels were significantly lower in the malnourished group 52.79 ± 6.30 mg/dL when compared to the control group 64.4 ± 6.73 mg/dL (Student's t test).

The effects of malnutrition on the expression of GLUT3 protein in the cerebral cortex of adult animals show that malnutrition caused a significant reduction in the expression of GLUT3 compared to control animals (Figure 2).

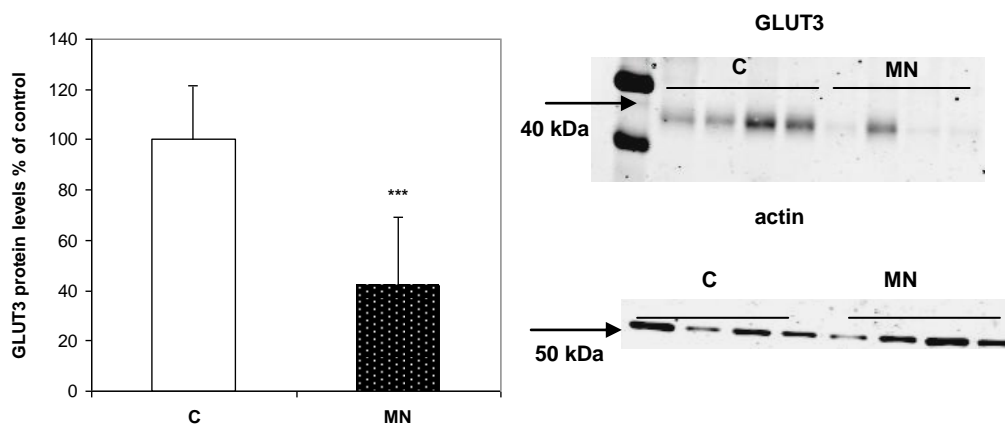


Figure 2- Expression of the GLUT3 transporter in cerebral cortex of control (C, $n=4$) and malnourished (MN, $n=4$) animals obtained of at least three Western blot. The bars represent the average percentage variation of GLUT3 protein after the values had been normalized using β -actin signal as a reference. In the left, infrared Western blot analysis showing on the top GLUT3, (band at 39 kDa), and in the bottom β -actin (β -actin, band at 50 kDa) in the cerebral cortex of control and malnourished rats. *** $P<0.001$, Student's t test.

Analysis of protein content in the three extracts of brain tissue preparations used for activity measures showed no significant difference in protein content between the experimental groups when compared with the same types of treatment between them. However, we observed a significant difference in protein content between the HCC homogenate and the other two treatments (Table 1).

Table1 - Effects of litter size and brain homogenate treatment on brain protein content and acetylcholinesterase (AChE) activity.

Groups	Protein content (mg/ml)			AChE (U/ml)		
	brain homogenate					
	HC	HCC	HLCT	HC	HCC	HLCT
Control	12.83 \pm 1.34 ^a	3.65 \pm 0.21 ^a	12.77 \pm 1.44 ^a	0.70 \pm 0.11 ^c	0.11 \pm 0.03 ^c	1.19 \pm 0.13 ^c
Malnourished	12.68 \pm 1.74 ^b	3.55 \pm 0.75 ^b	12.42 \pm 0.90 ^b	0.91 \pm 0.04 ^d	0.13 \pm 0.02 ^d	1.19 \pm 0.16 ^d

HCC, homogenate of cells (HC); homogenate centrifuged of cells; homogenate free of cells with triton.

^{a, b} $P<0.0001$ significant differences among homogenates compared into control and malnourished groups.

^{c, d} $P<0.001$ significant differences among homogenates compared into control and malnourished groups.

The evaluation of the activity of acetylcholinesterase in malnourished and control animals was performed in order to express the enzyme activity in U/ml and its specific activity in U/mg protein. Analysis showed a significant difference among the 3 different types of homogenates in the control ($P < 0.0001$) and malnourished ($P < 0.001$, Student's *t* test) groups (Table 1). The activity of the HCC homogenate was significantly lower than in other treatments, while in HLCT there was a significant increase when compared to the others. Increased activity of HLCT was possible due to the fact that the membranes were solubilized in Triton 0.5%, increasing availability of AChE fraction bound to the membrane.

The evaluation of the specific activity (U/mg protein) of the AChE showed that malnutrition caused a significant increase in the specific activity of AChE in the homogenate fraction of cells ($P < 0.05$, Student's *t* test) compared to the control group (Figure 3).

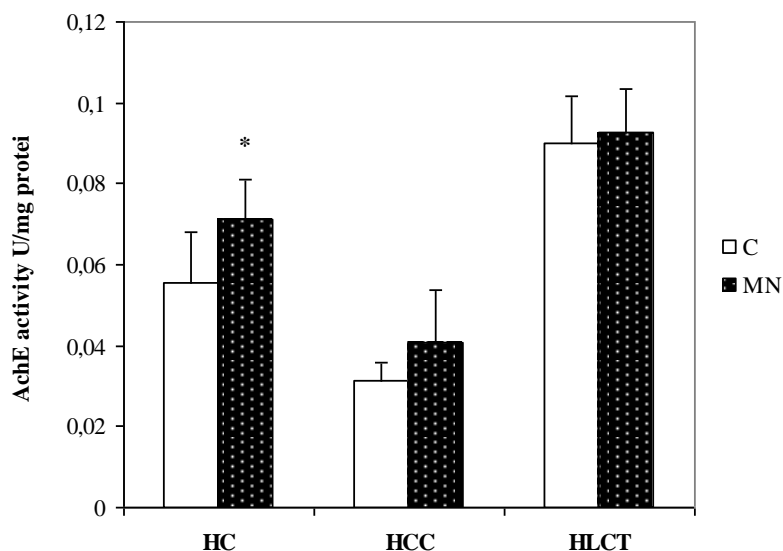


Figure 3- Specific activity of acetylcholinesterase (AChE) in brain tissue extracts from control (C, $n = 5$) and malnourished (MN, $n = 6$) animals. The bars represent the average activity of the enzyme in mg of protein for each type of extract \pm the standard deviation. $P < 0.05$, Student's *t* test.

Comparing the effects of the type of extract and nutritional status on the activity of acetylcholinesterase, was found a significant interaction ($P = 0.019$, *two-way* ANOVA, Tukey's test) between the two factors influencing the activity of the enzyme.

Discussion

The experimental model used in our study to induce protein-calorie malnutrition, larger number of pups per litter, was effective in reducing the body weight of the animals until the 42 days of life. After this age, body weight was similar to control animals. Nutrients restriction during the suckling period also induced reduction of the brain weight in the adulthood.

Suckling animals of dams submitted to different protein restriction diets or whose food supply was reduced by increasing the size of the litter, also showed reduction in brain weight when compared to control animals (Marin *et al.*, 1995; Rocha-de-Melo *et al.*, 2004, respectively). Comparing these results with ours, whose energy restriction was during the whole period of suckling, we emphasize that reduction of nutrients availability during brain growth sprout has important effects on brain development.

Food restriction in the animals of our study induced changes in the availability of primary energy substrate used by the brain: the glucose. Studies show that malnutrition in the intra-uterine and post-natal life cause resistance to insulin action (Jaquet *et al.*, 2001, Martin *et al.*, 2004, Lopes da Costa *et al.*, 2004) resulting in changes of blood glucose levels. Some authors report that the early postnatal malnutrition leads to resistance to insulin resulting in elevated glucose levels that persist even in adult life and characterize diabetes type II (Gavete *et al.*, 2005, Garcia-Souza *et al.*, 2008). In contrast, in a study in rats where malnutrition was caused by the consumption by dams of free-protein diet during

the lactation showed that the malnourished rats had higher insulin secretion induced by glucose than that of the control group (Lopes da Costa *et al.*, 2004). In another study, the effects of malnutrition on the expression of mRNA for insulin showed that maternal malnutrition caused increased levels of insulin mRNA of the offspring and when malnutrition was prolonged until adulthood a reduction in these levels was observed (Martin *et al.*, 2004).

The studies cited above show that the effects of malnutrition on the glucose and insulin secretion are variable according to the period and duration of nutritional restriction. In our animals, the nutritional restriction during the suckling period had the effect of reducing blood glucose levels of animals in adulthood. This change could be associated with high insulin secretion observed in early postnatal malnourished rats and consequent reduction of blood glucose levels in these animals. However, our data do not allow establishing this correlation because we don't have performed studies about insulin protein expression.

The effects of nutritional restriction during the suckling on the expression of GLUT3 in cerebral cortex of adult rats were first evaluated in our study. Our results demonstrated that nutritional restriction during the critical development of the brain reduced the expression of GLUT3 in the cerebral cortex.

Studies on the expression of glucose transporters in peripheral tissues show that malnutrition affects the expression of glucose transporters. Jaquet *et al.* (2004) showed that malnutrition in rats during intra-uterine life caused a reduction in mRNA for GLUT4 in heart and skeletal muscles. On the other hand, Gavete *et al.* (2002) reported that in skeletal muscle there was no change in GLUT4 protein but an increase in insulin stimulated translocation of the transporter. Lopes da Costa *et al.* (2004) reported in malnourished

animals during the weaning, increased expression of GLUT2 in hepatocyte and pancreatic beta cells.

The important reduction of GLUT3 in cerebral cortex of animals malnourished in our study could be explained in part by the decrease in blood glucose levels and lower brain weight of these animals compared to the control group. This could induce decreased glucose availability to neurons and thus a lower expression of GLUT3. On the other hand we can not exclude the contribution of other glucose transporters such as GLUT1 in the blood-brain barrier and astrocytes as major carriers of glucose to the brain parenchyma and the cerebral metabolism in general. In fact, according to studies by Pellerin and Magistretti (1994, 2004) during brain activation, the glucose is primary uptake by astrocytes and then metabolized to lactate that is transported to neurons, converted to pyruvate to produce energy via oxidative phosphorylation.

The hydrolysis of acetylcholine in the synaptic cleft by the action of acetylcholinesterase was assayed to investigate whether protein-energy malnutrition during lactation could alter metabolic functions other than the cerebral energy metabolism. Results demonstrated that activity of AChE bound to membrane has a more significant contribution on the degradation of acetylcholine in mammals, compared the soluble fraction dispersed in the synaptic cleft, also observed in studies on the molecular distribution of AChE in the cerebral cortex (Sáez-Valero *et al.*, 2003).

In our study, the activity of HCLT (on the membrane fraction) showed no significant difference between control and malnourished groups, similar to that occurs in ischemic states. However, the relationship between HCLT/HC was lower in malnourished animals caused by the increase in cholinesterase activity of the HC animals. The central cholinergic synapses play an important role in the acquisition and consolidation of memory (Das *et al.*, 2005). Patients with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease,

have increased levels and activity of AChE which contributes to deposition of beta-amyloid peptide, involved in neuronal damage (Amici *et al.*, 2001). Changes in activity of both isoforms of AChE in the hippocampus are related to cognitive deficits (Das *et al.*, 2005).

Beta-amyloid accumulation in neurons is responsible for the stimulation of slow calcium channels, contributing to the increased activity of AChE (Das *et al.*, 2005).

Malnutrition when occurs during the critical period of brain development leads to structural and metabolic changes observed in adulthood even after nutritional rehabilitation. In our study, food restriction during the critical development of the brain (suckling period) was enough to change important characteristic of the brain as demonstrated by reduction of expression of GLUT3 and the increased activity of acetylcholinesterase.

These results corroborate and add data on the effects of malnutrition on the development and function of the nervous system. For the first time a study has shown that early short-term malnutrition changes the expression of major neuronal glucose transporter, GLUT3. Associated with this the increased activity of acetylcholinesterase indicate that nutritional status may be a determining factor in the development of cognitive deficits that could be associated with changes in cerebral metabolic activity.

Acknowledgements

This work was partially supported by the governmental research foundation of Alagoas state (FAPEAL no. 20040930206-2).

References

Aid S, Vancassel S, Poumès-Ballihaut C, Chalon S, Guesnet P, Laviaille M (2003): Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *Journal of Lipid Research* 44: 1545-1551.

Agote M, Goya L, Ramos S, Alvarez C, Gavete ML, Pascual-Leone AM, Escrivá F (2001): Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:1101-1109.

Amici, S; Lanari, A; Romani, R; Antognelli, C; Gallai, V; Parnetti, L (2001): Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase activity after long-term treatment with donepezil and rivastigmina. *Mechanisms of Ageing and Development* 122: 2057–2062.

Benítez-Bribiesca, L; Rosa-Alvarez, ID; Mansilla-Olivares, A. (1999) Dendritic Spine Pathology in Infants With Severe Protein-Calorie Malnutrition. *Pediatrics* 2: 104

Blokland, A.(1996): Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Research Reviews* 21: 285-300.

Coupain, JG; Tyzbit, RS; Beecher, AR (1977): Influence of Altering Dietary Protein Levels during Early Development of the Rat on the Activity of Several Brain Enzymes *J. Nutr.* 107: 1102-1113.

Das, A; Dikshit, M; Nath, C. (2005): Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 81: 89–99.

Ellman,G.L.; Courtney K.D; Andres, V. and Featherstone, R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88- 95.

Feoli, A M.; Siqueira, I.; Almeida, LMV.; Tramontina, A.Ca.; Battu, C.; Wofchuk, ST.; Gottfried, C.; Perry, ML.; Gonçalves, CA (2006): Brain Glutathione Content and Glutamate Uptake Are Reduced in Rats Exposed to Pre- and Postnatal Protein Malnutrition. *The Journal of Nutrition* 136(9):2357-2361.

Garcia-Souza EP, da Silva SV, Félix GB, Rodrigues AL, de Freitas MS, Moura AS, Barja-Fidalgo C (2008): Maternal protein restriction during early lactation induces GLUT4 translocation and mTOR/Akt activation in adipocytes of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(3):E626-E636.

Gavete ML, Agote M, Martin MA, Alvarez C, Escriva F (2002): Effects of Chronic Undernutrition on Glucose Uptake and Glucose Transporter Proteins in Rat Heart. *Endocrinology* 143(11):4295–4303.

Gavete, ML, Martín, MA, Alvarez, C, Escriva, F (2005): Maternal Food Restriction Enhances Insulin-Induced GLUT-4 Translocation and Insulin Signaling Pathway in Skeletal Muscle from Suckling Rats, *Endocrinology* 146(8):3368–3378.

Jaquet D, Vidal H, Hankard R, Czernichow P, Levy-Marchal C (2001): Impaired regulation of glucose transporter 4 gene expression in insulin resistance associated with in utero undernutrition. *J Clin Endocrinol Metab* 86(7):3266-3271.

Keller, EA, Cuadra, GR, Molina VA, Orsincher, OA (1990): Perinatal Undernutrition Affects Brain Modulatory Capacity of β -Adrenergic Receptors in Adult Rats. *American J Nutr* 120(3):305-308.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685

Lopes Da Costa, C, Sampaio De Freitas, M, Sanchez Moura, A (2004): Insulin secretion and GLUT-2 expression in undernourished neonate rats. *J Nutr Biochem* 15(4):236-241.

Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, Randall, RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275.

Marin, MC, Tomás, ME, Serres, C, Mercury, O (1995): Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *J Nutr* 125(4):1017-1024.

Martín MA, Fernández E, Pascual-Leone AM, Escrivá F, Alvarez C (2004): Protein calorie restriction has opposite effects on glucose metabolism and insulin gene expression in fetal and adult rat endocrine pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(4):E542-E550.

Pellerin L, Magistretti PJ (1994): Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(22): 10625-10629.

Pellerin L, Magistretti PJ (2004): Neuroenergetics: Calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *The Neuroscientist* 10(1): 53-62.

Rocha-de-Melo, AP, Picanço-Diniz, CW, Borba, JMC., Santos-Monteiro, J, Guedes, RCA (2004): NADPH-diaphorase histochemical labeling patterns in the hippocampal neuropil and visual cortical neurons in weaned rats reared during lactation on different litter sizes. *Nutr Neurosci* 7: 207–216.

Rocha-de-Melo, AP, Cavalcanti, JB, Barros, AS, Guedes, RCA (2006): Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutritional Neuroscience* 9:155-160.

Sáez-Valero, J, González-García, C, Cenã, V (2003): Acetylcholinesterase activity and molecular isoform distribution are altered after focal cerebral ischemia. *Molecular Brain Research* 117: 240–244.

Shambaugh GE, Mankad B, Derecho ML, Koehler R (1987): Enzyme markers of maternal malnutrition in fetal rat brain. *J Nutr* 117(1):144-152.

Scrimshaw NS, Gordon JE (1968): *Malnutrition, learning and behaviour*. MIT Press, Cambridge/MA, 566.

Vannucci SJ (1994): Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. *J Neurochem* 62: 240–246.

Viana, GSB; Figueiredo, RMO; Bruno, JA (1997): Effects of protein-energy malnutrition on muscarinic receptor density and acetylcholinesterase activity in rat brain, *Annals of Nutrition & Metaboli*, 41(1): 52-59.

Villescas, R; Ostwald, R; Morimoto, H; Bennett, AL (1980): Behavior and biochemical brain parameters in rats. *The Journal of Nutrition*, 1103-1110

Ximenes-da-Silva A, Guedes RCA (1991): Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnutrition rats. *Brasilian J Med Biol Res* 24: 1277-1281

Warburton EC, Koder T, Cho K, Massey PV, Duguid G, Barker GRI, Aggleton JP, Bashir ZI, Brown MW (2003): Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron* 38: 987–996.

Wilson, DA; Fletcher, ML, Sullivan, RM (2004): Acetylcholine and Olfactory Perceptual Learning. *Learn. Mem.* 11: 28-34