

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

***Efeitos da Desnutrição Protéica sobre alguns Parâmetros
Bioquímicos Gliais e de Estresse Oxidativo no
Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central de Ratos***

Ana Maria Pandolfo Feoli

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas –Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2006

"Grandes realizações são possíveis quando se dá
atenção aos pequenos começos."
(Lao Tse)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Carlos Alberto, agradeço pela acolhida no laboratório, pela disponibilidade constante, pelo apoio, atenção e pelo exemplo de pesquisador, professor e orientador.

Ao Professor Perry, co-orientador deste trabalho, pela “segunda” acolhida e também pelo exemplo de pesquisador e professor.

À Carmem, pela atenção e disponibilidade e pelas valiosas contribuições ao longo deste trabalho.

A Ionara, pela amizade e exemplo de pesquisadora. Tenho certeza de que as muitas horas de trabalho valeram a pena.

À Lúcia, amiga, colega e parceira em padronização de técnicas.

A Ana Carolina, minha bolsista, por todo o apoio durante o trabalho.

À Marina, amiga e colega, pelas valiosas contribuições.

A Francine e à Juliana pela calorosa acolhida no laboratório.

A Ingrid, Liane, Cíntia Roehrig, amigas e colegas do tempo do mestrado que fazem parte desta trajetória.

A Cíntia Battú, pela participação solícita neste trabalho.

Aos colegas do laboratório 33, Patrícia, Letícia, Alessandra, Ana Cristina, Mariane, Daniela, Christopher, André, Giovana, Juliana, Lucas, Rafael e Regina pela ajuda e amizade e por fazerem do LABS100 um local tão agradável de se trabalhar.

A professora e colegas do laboratório vizinho (35), Profa Suzana, Dioguinho e Ana Paula pelos empréstimos e ajudas;

Aos funcionários da Secretaria e Biotério;

À UFRGS e, em especial ao CPG Bioquímica, pela valiosa oportunidade.

Às minhas colegas da PUCRS, pelo apoio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho.

A PUCRS, pelo incentivo.

À minha família pelo afeto e por estarem sempre presentes.

Ao João, meu marido, pelo carinho e estímulo durante todos estes anos.

SUMÁRIO

PARTE I	
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. Desnutrição no Mundo	6
1.2. Conceito de Desnutrição	7
1.3. Conseqüências da Desnutrição	7
1.4. Modelo Experimental da Desnutrição	8
1.5. Desenvolvimento Cerebral e Desnutrição	9
1.5.1. Desenvolvimento e Crescimento Cerebral	9
1.5.2. Efeitos da Desnutrição Protéica sobre o Desenvolvimento Cerebral.....	13
1.6. Marcadores Gliais de Maturação e Injúria	14
1.6.1 GFAP	14
1.6.2. S100B	15
1.7. Estresse Oxidativo no Sistema Nervoso Central	17
1.7.1 Glutathione	19
1.7.2. Metabolismo da Glutathione do Sistema Nervoso Central.....	21
1.7.3. Efeitos da Desnutrição sobre o Estresse Oxidativo	22
1.8. Metabolismo do Glutamato no Sistema Nervoso Central	23
1.8.1. Excitotoxicidade do Glutamato	27
1.8.2. Efeitos da Desnutrição sobre Parâmetros alguns Glutamatérgicos	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo Geral	30
2.2. Objetivos Específicos	30
PARTE II	
Artigo 1 - Developmental changes in content of glial fibrillary acidic and S100B proteins in rats exposed to protein malnutrition.....	31
Artigo 2 - Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to protein malnutrition.....	54
Artigo 3 - Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain.....	84
PARTE III	
1. Discussão	91
2. Conclusões	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXOS	
LISTA DE FIGURAS.....	122

PARTE I

RESUMO

Etapas do desenvolvimento ontogenético cerebral, incluindo proliferação e migração, etapas de crescimento cerebral e mielinização, astrocitogênese e morte celular programada são alteradas pela desnutrição protéica. O SNC (Sistema Nervoso Central) é particularmente suscetível aos insultos oxidativos. As defesas antioxidantes são dependentes do conteúdo de glutathione e as vias metabólicas envolvidas nesta manutenção contam com o suporte dos astrócitos (principalmente a captação de glutamato e a síntese de glutamina), especialmente durante o desenvolvimento. O presente trabalho avaliou marcadores gliais, por meio do imunoconteúdo da GFAP (proteína glial fibrilar acídica) e S100B em córtex cerebral, hipocampo, cerebelo e líquido, bem como o conteúdo de glutathione, atividade da glutamina sintetase e captação de glutamato de ratos expostos à desnutrição protéica pré e pós-natal (grupo controle: 25% caseína e grupo desnutrido: 7% de caseína) aos 2, 15 e 60 dias pós-natal. Foram avaliados também alguns parâmetros de estresse oxidativo. Em ratos desnutridos foi encontrado aumento do imunoconteúdo da GFAP em todas as regiões estudadas aos 2 dias, mas houve significativa redução de GFAP em hipocampo e cerebelo aos 15 dias. O aumento de S100B foi também observado em todas as regiões aos 2 dias pós-natal. Não foram encontradas mudanças no conteúdo de GFAP e S100B em ratos desnutridos aos 60 dias. Entretanto, no líquido, os níveis de S100B, permaneceram elevados aos 60 dias. Os resultados deste trabalho indicam precoce astrogliogênese ao nascimento e um atraso da astrogliogênese pós-natal induzida pela restrição protéica. Alterações astrocíticas específicas em hipocampo e cerebelo enfatizam a vulnerabilidade das regiões do SNC ao insulto nutricional. Estas alterações foram transitórias, mas o elevado nível extracelular de S100B em animais adultos sugerem a suscetibilidade ao dano. Embora o perfil ontogenético de glutathione do grupo desnutrido tenha sido similar ao grupo controle, os desnutridos apresentaram níveis significativamente mais baixos aos 2 e 15 dias. Além disso, a atividade da glutathione peroxidase e reatividade antioxidante total foram reduzidas em ratos desnutridos aos 2 dias. O aumento da atividade da glutamina sintetase e a redução na captação de glutamato foram também encontrados nos ratos desnutridos. Estas alterações indicam mudanças no metabolismo dos astrócitos, sugerindo aumento da vulnerabilidade a excitotoxicidade e/ou dano oxidativo. Em animais de 60 dias, a desnutrição alterou alguns parâmetros de estresse oxidativo, como o aumento da lipoperoxidação em cerebelo e córtex cerebral e uma redução dos conteúdos de tirosina e triptofano em todas as estruturas estudadas, indicando dano em macromoléculas. Assim, a recuperação de alterações nos parâmetros metabólicos, observadas na vida adulta, apesar da continuidade do insulto nutricional, não exclui o aumento do dano oxidativo em lipídios e proteínas.

Palavras-chave: *Desnutrição protéica, marcadores gliais, glutathione cerebral, estresse oxidativo.*

ABSTRACT

Several ontogenetic stages of brain development, including proliferation and migration, brain growth spurt and myelination, astrocytogenesis and programmed cell death, are altered by protein malnutrition. The brain is particularly susceptible to oxidative insults, and its antioxidant defense is dependent on its glutathione content and related metabolic pathways predominantly played by astrocytes (particularly glutamate uptake and glutamine synthesis), especially during development. This work evaluated specific glial commitment of rats exposed to pre and postnatal protein malnutrition (control: 25% casein and protein malnutrition: 7% casein) based on glial fibrillary acid protein (GFAP) and S100B immunocentents in cerebral cortex, hippocampus, cerebellum and cerebrospinal fluid, on 2nd, 15th and 60th postnatal days, as well, glutathione content, glutamine synthetase activity, glutamate uptake activity and parameters of oxidative status. We found an increase of GFAP in all these regions on 2nd postnatal day, but a significant decrease of GFAP in hippocampus and cerebellum on 15th postnatal day. An increment of S100B also was observed in all regions only on 2nd postnatal. No changes in the brain contents of GFAP and S100B were found for these proteins on 60th postnatal day in malnourished rats. However, cerebrospinal fluid S100B levels, which was early elevated, remains elevated on 60th postnatal day. Our data support the concept of precocious astrogliogenesis at birth and delayed postnatal astrocytogenesis induced by protein malnutrition. Specific astrocytic alterations in hippocampus and cerebellum emphasize the regional brain vulnerability to malnutrition, possibly associated to intense postnatal neurogenesis and synaptogenesis of these regions. These alterations are transitory, but the persistent elevated extracellular S100B levels in adult rats suggest somehow brain damage or risk to brain diseases. Although malnourished rats exhibited a similar ontogenetic profile of glutathione levels in brain tissue, they had lower levels on the 2nd and 15th postnatal days. In addition, we found other changes such as reduced TAR and glutathione peroxidase activity on the 2nd postnatal day. Moreover, elevated activity of glutamine synthetase and reduced glutamate uptake activity were also found in malnourished rats. Taken together, these alterations indicate specific changes in astrocyte metabolism, possibly responsible for a higher vulnerability to excitotoxic/oxidative damage in malnourished animals. On 60th postnatal day protein malnutrition altered various parameters of oxidative stress, specially damage to macromolecules. There was an increase in TBARS levels, the index of lipid peroxidation, in cerebellum and cerebral cortex from protein malnourished rats. Moreover, a significant reduction on both amino acids levels (tryptophan and tyrosine) in all tested brain structures was observed. The lower antioxidant defense appears to be the main alteration that causes oxidative imbalance rather than an increase of reactive oxygen species. Moreover, a recovery of altered metabolic parameters observed during adulthood, despite the persistent protein malnutrition insult, not excluded enhanced the oxidative damage to lipids and proteins from studied brain areas.

Key Words: *Protein malnutrition, glial markers, brain glutathione, oxidative stress.*

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: ácido α -amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

ANOVA: análise de variância

Cys: aminoácido cisteína

EAAC: carreador de aminoácidos excitatórios

EAAT: transportador de aminoácidos excitatórios

EDTA: ácido etileno di-amino-tetracético

EGTA: éter etileno glicol-bis (β -amino etílico)

ELISA: enzyme linked imunoassay

DCFH-DA: 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato

DCF: 2'-7'- diclorofluoresceína

DNA: ácido desoxirribonucléico

DTNB: ácido 5,5' - ditiobis-2-nitrobenzóico

GABA: ácido γ -aminobutírico

GCS: gama-glutamil-cisteína sintetase

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

GLAST: transportador de glutamato e aspartato

Gln: glutamina

GLT-1: transportador glial 1

GLU: glutamato

GPx: glutationala peroxidase

GR: glutationala redutase

MDA: Malondialdeído

MAP-1: proteína tipo-1 associada aos microtúbulos

MAP-5: proteína tipo-5 associada aos microtúbulos

MK-801: (+)-5-metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina ou dizocilpina

NMDA: N-metil-D-aspartato

PBS: Salina tamponada com fosfato ("phosphat buffer saline)

PMSF: Fenilmetil-sulfonilfluoreto

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: Superóxido dismutase

TAR: Reatividade antioxidante total

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

ROS: Espécies reativas de oxigênio

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desnutrição no Mundo

A fome e a desnutrição permanecem entre as principais conseqüências da pobreza mundial, notadamente entre os países em desenvolvimento. Aproximadamente 30% das pessoas – em especial crianças, adolescentes e idosos em países em desenvolvimento – sofrem de um ou mais tipos de desnutrição (WHO 2000; FAO/WHO 2004; FAO/WHO 2005).

Estima-se que, no mundo, mais de um terço das crianças menores de 5 anos sofre de desnutrição grave ou moderada, sendo que desse, 80% são asiáticas, 15% africanas e 5% latino-americanas. Um total de 43% das crianças em países em desenvolvimento sofrerá desnutrição em algum momento de suas vidas (WHO 2000; FAO/WHO 2004; FAO/WHO 2005).

O Brasil, onde as desigualdades regionais são expressivas, vive situação de transição nutricional¹, exigindo estratégias de saúde pública capazes de garantir um modelo de atenção à saúde e de cuidado nutricional, direcionado para a prevenção da desnutrição e segurança alimentar², como também do sobrepeso, da obesidade e das demais doenças crônicas não transmissíveis – resultantes da inadequação alimentar. A desnutrição na infância, que se expressa no baixo peso, no atraso no crescimento e

¹O conceito de transição nutricional diz respeito a mudanças seculares em padrões nutricionais resultam de modificações na estrutura da dieta dos indivíduos e que se correlacionam com mudanças econômicas, sociais, demográficas e relacionadas à saúde (POPKIN et al., 1993).

²Segurança Alimentar é a realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras de saúde, que respeitem a diversidade cultural e que sejam social, econômica e ambientalmente sustentáveis (BRASIL, 2004).

desenvolvimento, maior vulnerabilidade às infecções e no maior risco para ocorrência futuras de doenças crônicas não-transmissíveis, continua sendo importante problema de saúde pública, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (Monteiro et al., 1995; Batista Filho e Rissin, 2003; BRASIL, 2004)

1.2. Conceito de Desnutrição

O termo “desnutrição” pode abrigar diferentes significados. Para Morgane e colaboradores (2002), o termo “subnutrição” (undernutrition) indica uma desnutrição energética, onde existe deficiência global de nutrientes. Por outro lado, o termo “má nutrição” (malnutrition) implica em proporções desequilibradas de um ou mais nutrientes, referindo-se à sua deficiência ou excesso. Desta forma, etimologicamente, podem receber o conceito de desnutrição estados determinados por deficiência quantitativa (energia) ou qualitativa (um ou mais nutrientes), consumo alimentar excessivo e mesmo certas doenças metabólicas características de desvios da nutrição normal. Nesta tese, o termo desnutrição será reservado à deficiência de proteína.

1.3. Conseqüências da Desnutrição

Recentes evidências sugerem que doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes mellitus, hipertensão, aterosclerose e doenças cardiovasculares, têm origem em alterações ocorridas no útero e durante o início da vida pós-natal (Joshi et al., 2003).

Estudos em roedores mostram que a desnutrição protéica fetal resulta em déficit de crescimento intra-uterino e aumenta a incidência de doenças como diabetes mellitus tipo 2. Alterações como diminuição da proliferação,

tamanho e vascularização das células pancreáticas, além do menor conteúdo de insulina e apoptose, foram identificadas em animais com desnutrição protéica e conseqüente baixo peso ao nascer. Estas mudanças funcionais, induzidas por uma dieta hipoprotéica no período gestacional, são persistentes e, na vida adulta, contribuem para o desenvolvimento da intolerância à glicose (Sparre et al., 2003). A adaptação e/ou programação metabólica inclui a redistribuição do fluxo sanguíneo fetal para o cérebro como forma de preservar este órgão em detrimento dos demais. A programação metabólica é um conceito definido por um processo em que um insulto, ocorrido em um período crítico de desenvolvimento, resulta em alterações permanentes na estrutura e/ou função de um órgão ou ação metabólica (Petry e Ozanne, 2001).

1.4. Modelo Experimental de Desnutrição

Nosso grupo de pesquisa adota, há vários anos, o modelo de desnutrição contendo 7 - 8% de proteína para o grupo experimental, com dieta isocalórica ao grupo controle (com 25% de proteína) a fim de estudar diferentes parâmetros neurobioquímicos e comportamentais (Rotta et al., 1999, 2002, 2003; Schweigert et al, 2005). As ratas recebem dieta hipoprotéica a partir do dia do acasalamento. A ninhada (padronizada em 8 filhotes por mãe), quando desmamada (21 dias pós-natal), passa a receber a mesma dieta da mãe, *ad libitum*, até a idade experimental. A redução do nível de proteína na dieta oferecida às mães é caracterizada pela restrição da quantidade total de nutrientes acessíveis aos filhotes. Assim, as ratas lactentes desenvolvem desnutrição protéica e os filhotes, desnutrição protéico-calórica (Pine et al., 1997; Passos et al., 2000).

1.5. Desenvolvimento Cerebral e Desnutrição

1.5.1. Desenvolvimento e Crescimento Cerebral

A maturação do SNC e desenvolvimento da capacidade cognitiva dependem de três fatores essenciais: potencial genético do indivíduo, estímulo ambiental e nutrição adequada. Alterações no desenvolvimento cerebral pré-natal em humanos, a partir de um ou da combinação desses fatores, podem resultar em vários graus de disfunção cerebral (Morgane et al., 1993; Kehoe et al., 2001).

Fatores exógenos, como a desnutrição, podem alterar a atividade de enzimas e interferir na síntese e a estrutura de proteínas, bem como a incorporação de lipídios em vários tecidos (Kawaguchi, 1988; Levistky e Strupp, 1995). Alterações nos componentes envolvidos nos eventos de maturação cerebral, como as alterações na produção seqüencial de classes particulares de neurônios, interromperão o crescimento ordenado e a elaboração do circuito neuronal (Morgane et al., 2002).

Em muitos animais ao nascimento, o SNC, diferentemente de outros tecidos, está ainda imaturo e passa por substanciais mudanças quantitativas e qualitativas durante o desenvolvimento pós-natal. Elementos quantitativos representam o aumento no número de células (hiperplasia). Já mudanças qualitativas refletem uma série de processos que ocorrem principalmente, ou exclusivamente, durante o desenvolvimento. Estes incluem: divisão celular, diferenciação e migração, formação e eliminação das sinapses, morte celular programada e formação de redes neuronais (Erecinska et al., 2004).

O termo “desenvolvimento cerebral”³ é freqüentemente tratado na literatura como crescimento total ou ganho no peso total do cérebro. O mais adequado, entretanto, é considerar que desenvolvimento cerebral inclui a síntese de componentes celulares, como ácidos nucléicos e proteínas, em paralelo à neurogênese e à gliogênese, migração de neurônios e células gliais, e diferenciação celular com aumento no tamanho da célula (Morgane et al., 2002).

O “período crítico” representa uma etapa única no desenvolvimento, que não pode ser revertida ou repetida posteriormente. Nesse caso, o período crítico caracteriza-se pelo fato de que processos organizacionais são modificados ou interrompidos mais facilmente neste período, quando os mesmos acontecem mais rapidamente. Os períodos críticos apresentam duração e importância que dependerá da velocidade de mudança nestes processos (Morgane et al., 2002).

O crescimento e a maturação do SNC em mamíferos pode ser dividido em quatro estágios: a) gênese de células neurais seguida de migração; b) proliferação axonal e dendrítica; c) sinaptogênese e d) mielinização axonal. As diferentes regiões do SNC apresentam diferentes tipos celulares com características específicas de divisão. Assim, a maturidade do SNC envolve uma série de estágios sobrepostos temporalmente que seguem uma seqüência precisa, diferindo de região para região cerebral e mesmo dentro de uma região particular, além de variar temporalmente de uma espécie animal para outra (Morgane et al., 2002).

³ Cabe também salientar que nesta tese utilizaremos a expressão “desenvolvimento cerebral” como sinônimo de “desenvolvimento do sistema nervoso central”, embora isso eventualmente possa trazer alguma dificuldade ao leitor.

No rato, a hiperplasia neuronal prevalece na vida pré-natal, ocorrendo principalmente durante a última semana de gestação (Dobbing, 1971). A neurogênese pós-natal é pequena quantitativamente, com produção de microneurônios com axônios curtos, especialmente no córtex cerebelar e hipocampo (Altman e Das, 1966; Croskerry et al, 1973, Levistky e Strupp, 1995). As células gliais apresentam proliferação principalmente pós-natal, ocorrendo durante o período de lactação. A sinaptogênese ocorre principalmente entre o 7° e 21° dia de vida pós-natal, podendo diferir de região para região. O aumento nos contatos sinápticos e a diferenciação destas conexões representam o começo do desenvolvimento químico e funcional do SNC (Morgane et al., 2002). A mielinização, no rato, inicia entre 10 e 15 dias de idade e alcança um pico de velocidade máxima aos 20 dias, quando declina abruptamente, alcançando os níveis de adultos (Davidson e Dobbing, 1966).

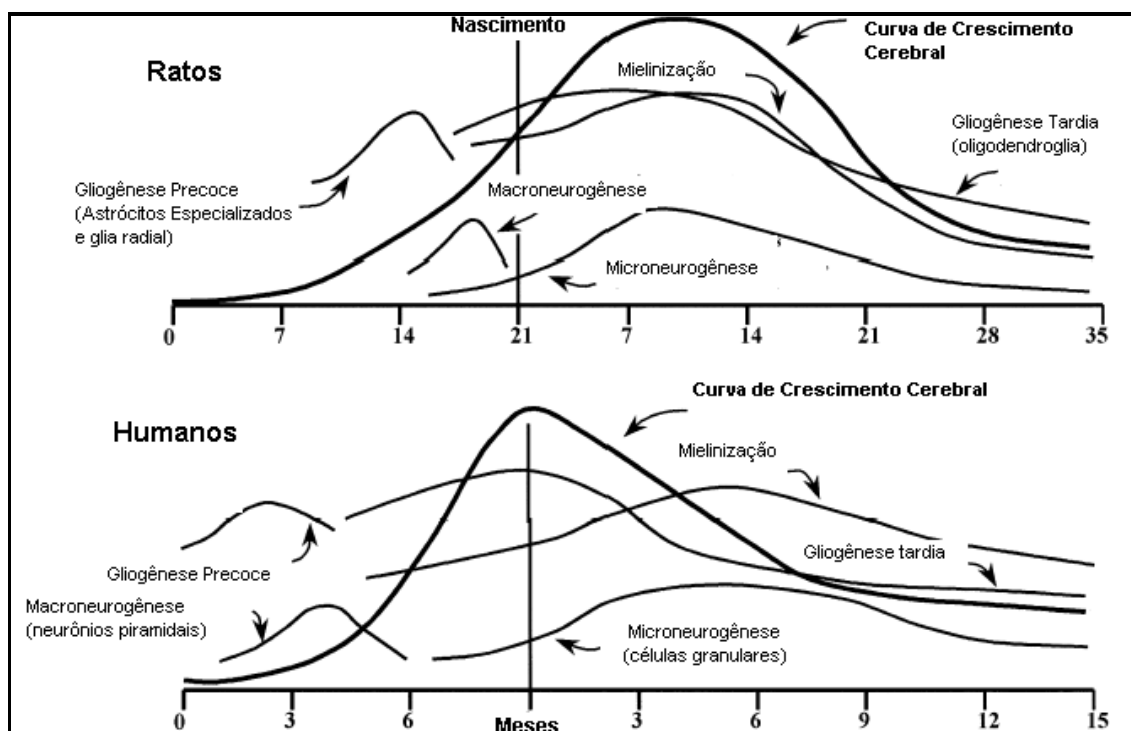


Figura 1. Curva de Velocidade, comparando os índices relativos, duração e tempo do processo de desenvolvimento específicos no SNC de ratos e humanos. As curvas de rápido crescimento cerebral (índices de mudanças no peso cerebral) são sobrepostas em relação aos eventos relativos ao desenvolvimento do SNC. A gênese precoce de astroglia e células piramidais em humanos resulta na aquisição de aproximadamente 27% do peso cerebral adulto no tempo do nascimento, comparando a aproximadamente 12% do peso cerebral adulto visto em ratos ao nascimento. A curva de rápido crescimento cerebral em ratos é deslocada para a direita, comparado aos humanos. Fonte: Adaptado de Morgane et al., 2002.

A estrutura definitiva do SNC estabelece-se durante o estágio de histogênese, o qual ocorre com as células pós-mitóticas migrando a partir da zona germinativa, diferenciando-se e interagindo, e envolvendo tecidos não-neurais, em uma série de eventos altamente ordenados e seqüenciais (Morgane et al, 2002). O desenvolvimento normal não depende somente de sua exata seqüência de fases desenvolvimentais, mas também de múltiplas reações metabólicas que regulam estes eventos celulares (Rodier 1980).

1.5.2. Efeitos da Desnutrição Protéica Sobre o Desenvolvimento Cerebral

De forma geral, em países em desenvolvimento a desnutrição gestacional prevalece à desnutrição pós-natal e está claramente associada ao retardo cognitivo e desempenho escolar em crianças (Rosso 1987, Hall et al., 2001). O período do insulto é um elemento crítico nestes estudos. Dados obtidos de trabalhos com animais e humanos revelam claramente que a desnutrição imposta nas fases iniciais do desenvolvimento tem efeitos mais severos e permanentes (Winick, 1970; Joshi *et al.*, 2003). Um insulto nutricional, quando aplicado durante o “período crítico”, tem conseqüências neurológicas graves.

Em modelos animais, os efeitos da desnutrição pré e pós-natal no desenvolvimento do SNC têm sido amplamente estudados (Morgane, et. al., 1993, Keohe et. al., 2001, Montanha-Rojas et al, 2005). Gressens e colaboradores (1997) mostraram que a desnutrição protéica (5% de proteína) durante o período embrionário (desde a concepção e durante as duas primeiras semanas de gestação) causou atraso na astrocitogênese (indicada pelo decréscimo da GFAP - “glial fibrillary acidic protein”), diferenciação neuronal anormal (observado pela reduzida expressão de MAP-5 e aumentada expressão de MAP-1) e sinaptogênese anormal (mostrada pela expressão aumentada de sinaptofisina no gânglio basal) em ratos em desenvolvimento, e a normalização dos parâmetros de citoarquitetura, diferenciação neuronal e glial em animais adultos.

A desnutrição pré-natal causou alterações na morfologia de células hipocâmpais (Diaz-Cintra et al., 1994) no número e na distribuição de

neurotransmissores (Fiacco et al., 2003) e no desempenho em tarefas comportamentais envolvendo o hipocampo (Tonkiss et al., 1993).

Granados-Rojas e colaboradores (2002) observaram que a desnutrição protéica pré-natal produziu um decréscimo no volume de fibras musgosas da região CA3 hipocampal, na densidade numérica de sinapses assimétricas e conseqüente redução no número total deste tipo de sinapse em ratos adultos. Essas alterações demonstram que a desnutrição protéica pré-natal induz efeitos deletérios permanentes na progressão de etapas do desenvolvimento que controlam a sinaptogênese e/ou consolidação sináptica, provavelmente por afetar múltiplos processos celulares.

1.6. Marcadores Gliais de Maturação e Injúria

1.6.1. GFAP

A GFAP (proteína fibrilar glial ácida) é uma proteína de filamentos intermediários, tem peso molecular de 47 kDa e é marcadora de astrócitos maduros. Como membro da família de proteínas do citoesqueleto, a GFAP modula a motilidade e a forma dos astrócitos por fornecer estabilidade estrutural aos processos astrocíticos. Os níveis de GFAP são regulados a partir do desenvolvimento do SNC no período pós-natal, quando ocorre a gliogênese mais intensa, e sob condições patológicas (Eng et al., 2000; Eng, 1985).

A expressão aumentada de GFAP (astroglíose) é uma das características das reações astrocíticas observadas em injúrias ao SNC, como trauma, desordens genéticas, insultos químicos e doenças de Alzheimer e Parkinson (Eng et al., 2000; Eng, 1985).

Assim, estudos sobre a regulação da GFAP têm sido úteis para entender melhor a fisiologia cerebral, bem como as doenças neurológicas. Moduladores

da expressão desta proteína incluem hormônios como glicocorticóides, tireóideo, citocinas (He et al., 2005), e fatores de crescimento como fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (Eng et al., 2000; Eng, 1985).

1.6.2. S100B

No SNC, a S100B é uma proteína produzida e secretada pelos astrócitos a qual compartilha com as demais proteínas da família S100 a propriedade de ligar Ca^{2+} . Ela tem o importante papel de mediador de sinais de Ca^{2+} no crescimento, diferenciação e mobilidade celular (Donato, 2001; Van Eldik e Wainwright, 2003).

A S100B pode ser encontrada no citoplasma, associada à membrana plasmática ou outras membranas intracelulares e ao citoesqueleto, o que sugere seu envolvimento em diversos processos celulares (Donato, 2001).

As funções extracelulares exercidas pela S100B dependem muito da sua concentração. Foi demonstrado *in vitro* que, em concentrações micromolares, a S100B exerce um efeito tóxico sobre as células vizinhas e, em concentrações nanomolares, desempenha um papel neurotrófico (Donato, 2001).

Tem sido postulada a importância da S100B como fator neurotrófico durante o desenvolvimento cerebral. O tratamento de culturas de astrócitos com S100B em concentrações nanomolares, ativa a ERK, uma proteína chave em processos de transdução de sinais regulando principalmente a proliferação celular (Gonçalves et al., 2000, Van Eldik e Wainwright, 2003). Ela estimula a sobrevivência e extensão de neuritos e facilita a sobrevivência de neurônios durante o desenvolvimento (Van Eldik et al., 1991) e após injúria (Barger et al., 1995). Outro mecanismo de ação trófica da S100B é sua ligação ao RAGE

("Receptor for Advanced Glycation End products") promovendo a translocação nuclear de NF-KB e a regulação positiva do fator anti-apoptótico Bcl-2 em neurônios (Huttunen et al., 2000; Hofmann et al., 1999).

Apesar dos seus efeitos neurotróficos, a S100B extracelular, em concentrações micromolares, é considerada neurotóxica. Concentrações altas dessa proteína são encontradas em cérebro de pacientes com síndrome de Down e doença de Alzheimer, sugerindo o envolvimento da S100B na patogenia dessas doenças (Donato, 2001).

Além disso, a S100B também é capaz de induzir a apoptose em culturas de neurônios e astrócitos (Fano et al., 1993; Hu et al., 1997). Huttunen e colaboradores (2000) demonstraram que a S100B induz apoptose em neurônios pela ativação do RAGE. Esta interação, S100B/RAGE, resultou num aumento das espécies reativas de oxigênio, liberação do citocromo C e ativação da cascata das caspases. Outro estudo demonstrou que esta proteína pode estimular a expressão do RNAm da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e aumentar a atividade desta enzima em astrócitos (Hu et al., 1996). Assim, há uma elevada produção de óxido nítrico e seus derivados neurotóxicos, o que resulta na morte de células neuronais por estresse oxidativo (Hu et al., 1997).

A S100B atua intracelularmente modulando o ciclo celular e o citoesqueleto, tendo como um dos alvos a própria GFAP. Em nosso laboratório foi mostrado que a S100B atua na regulação do sistema fosforilante da GFAP, pois uma vez presente no meio de incubação da fração citoesquelética obtida do hipocampo de ratos jovens, reduz a fosforilação dessa proteína (Ziegler et al., 1998). Portanto, a S100B exibe uma atividade dinâmica modulada por

fosforilação e desfosforilação, efetuando papel fundamental na plasticidade astrocítica (Rodnight et al., 1997).

1.7. Estresse Oxidativo no SNC

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais livres como superóxido (O_2^-), e radicais hidroxil ($OH\cdot$), peroxil ($ROO\cdot$) e óxido nítrico (NO) são continuamente gerados durante o metabolismo oxidativo normal. O excesso de radicais livres pode ser responsável pela oxidação de moléculas biológicas, resultando em peroxidação dos lipídios de membranas, dano às proteínas e aos ácidos nucleicos. Como resultado da peroxidação de ácidos graxos ocorre a produção de aldeídos como o malondialdeído, o qual pode ser quimicamente reativo, afetar a integridade dos processos fisiológicos, como a fluidez, a permeabilidade, a atividade de proteínas de membrana (receptores e canais iônicos) e levar à ruptura de membranas de organelas e da própria célula. As membranas celulares formadas por lipídios poliinsaturados são particularmente vulneráveis ao ataque de radicais livres (Halliwell, 1992; Halliwell et al., 2000).

Os aminoácidos das proteínas podem ser danificados por radicais livres altamente reativos, podendo chegar a alterações ou inativação de enzimas. A oxidação dos aminoácidos depende de sua estrutura, porém é mais comum em resíduos arginina, lisina, prolina, histidina, triptofano, metionina, tirosina, e fenilalanina (Requena et al., 2001).

O sistema de defesa antioxidante inclui enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR). A SOD converte radicais superóxido em H_2O_2 . A CAT é responsável pela detoxificação de H_2O_2 , formando oxigênio e água. A GPx

catalisa a reação dos peróxidos derivados da oxidação dos fosfolipídios de membranas, utilizando a glutathione (GSH) como doadora de elétrons formando glutathione oxidada (GSSG), a qual é reciclada pela glutathione redutase. Além disso, os antioxidantes não enzimáticos (carotenóides, vitamina E, vitamina C, glutathione e polifenóis) são também importantes mecanismos de defesa (Halliwell et al., 2000; Dringer, 2000), figura 2.

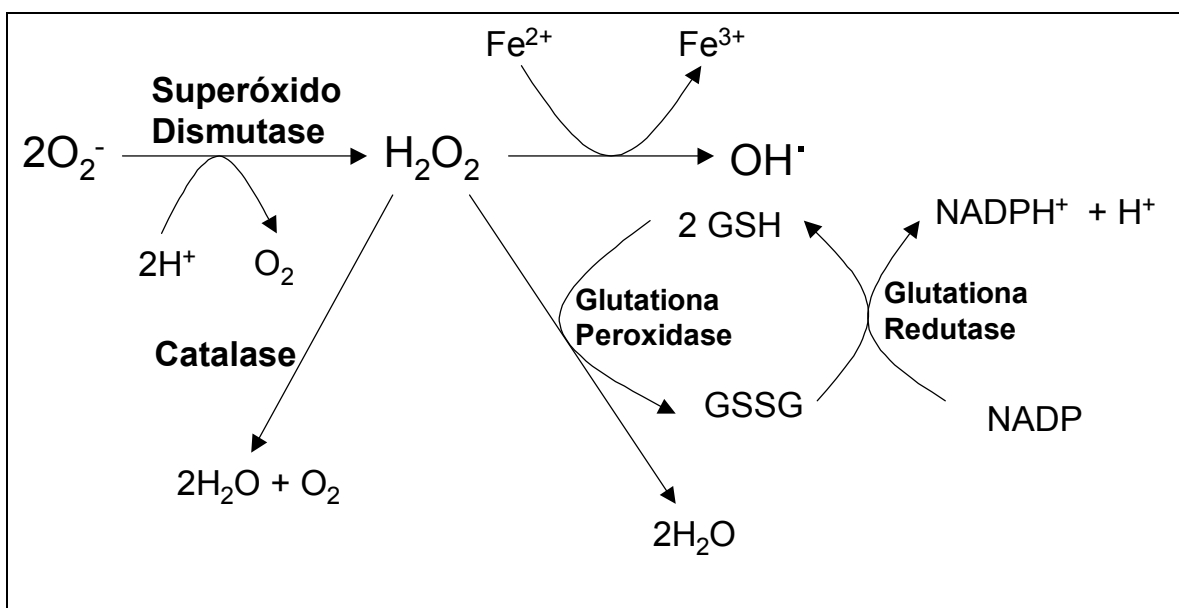


Figura 2. **Defesa enzimática contra os radicais livres.** O superóxido gerado pela cadeia respiratória é convertido pela (superóxido dismutase) SOD para H_2O_2 . As enzimas catalase e Glutathione Peroxidase (GPx) catalisam a reação de H_2O_2 . A glutathione reduzida (GSH) doa elétrons formando glutathione oxidada (GSSG).

O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a diminuição da capacidade antioxidante das células é denominado estresse oxidativo (Dringer et al., 2000).

O estresse oxidativo tem sido relacionado à patologia de diversas doenças, incluindo aquelas do SNC (Halliwell, 1992; Mates et. al., 2002). Comparado com outros órgãos, o cérebro é mais vulnerável ao estresse oxidativo. As células cerebrais utilizam 20% do oxigênio consumido no organismo, porém representam somente 2% do peso corporal, indicando alta atividade oxidativa. O cérebro tem alto conteúdo de ácidos graxos

poliinsaturados, mais suscetíveis à lipoperoxidação. E contém moderadas atividades da SOD, catalase e GPx comparadas ao fígado e rim (Cooper e Kristal, 1997).

1.7.1. Glutathione

O tripeptídeo gama-glutamilcisteinilglicina (GSH), denominado de glutathione, é considerado o principal antioxidante não enzimático celular. Em sua forma reduzida (GSH), a glutathione está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (0,5-10mmol/L). Grande parte da GSH (85-90%) está presente no citosol, e o restante em organelas como mitocôndria e peroxissomas. As concentrações de GSH extracelulares são relativamente baixas (2-20umol/L no plasma) (Lu, 2000).

A síntese de GSH ocorre a partir de glutamato, cisteína e glicina catalisada por 2 enzimas citosólicas: a gama-glutamilcisteína sintetase (GCS) e glutathione sintetase (Meister, 1974). Sua síntese ocorre em todas as células, sendo o fígado o maior responsável pela produção e disponibilização de glutathione para as células e tecidos. Na reação catalisada pela GCS, o grupo γ -carboxil do glutamato reage com o grupo amino da cisteína e origina uma ligação peptídica que protege a glutathione da hidrólise das peptidases intracelulares. A glutathione sintetase catalisa a última etapa da síntese de GSH (Richman e Meister, 1975; Misra e Griffith, 1998; Dringen et al., 2000; Dringen, 2000), figura 3

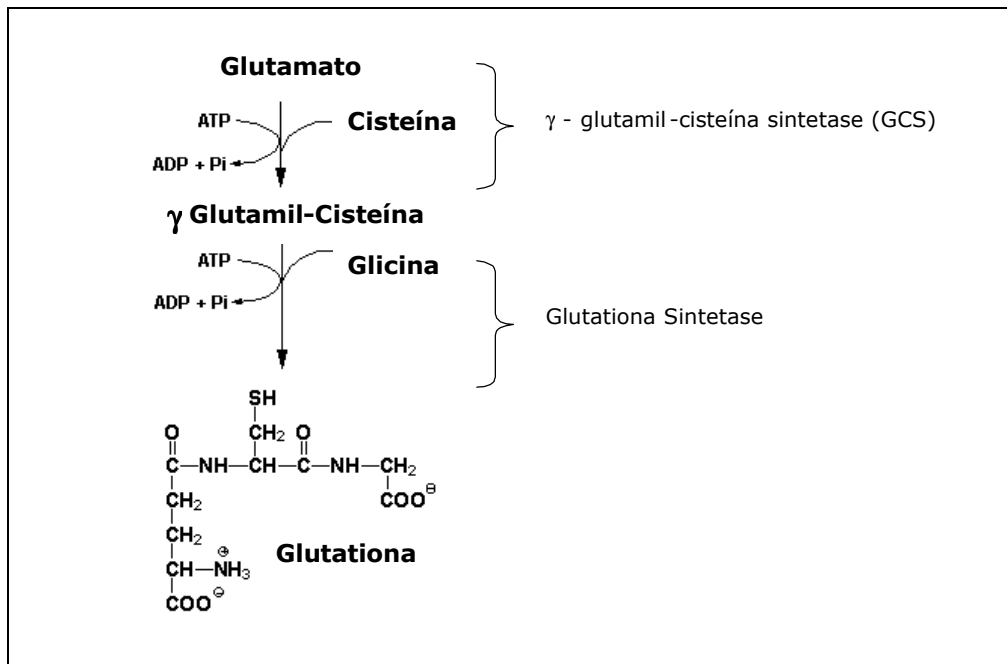


Figura 3. Esquema ilustrativo da síntese de glutathione.

O produto da oxidação de GSH, GSSG, é tóxico para as células e rapidamente convertido em GSH pela enzima glutathione redutase (Hall, 1999).

A cisteína é um aminoácido limitante para a síntese de GSH em diversas espécies animais, inclusive em roedores e mesmo em humanos. Assim, fatores (insulina, fatores de crescimento) que estimulam a captação de cisteína (cistina) pelas células aumentam as concentrações intracelulares de GSH. Como a cisteína pode ser gerada a partir de metionina, a metionina da dieta pode recolocar cisteína para a síntese de GSH. A cisteína é rapidamente oxidada para cistina em meios extracelular. Desta forma, as concentrações plasmáticas de cisteína são baixas (10-25umol/L), comparadas com a concentração de cistina (50-150umol/L) (Mates et al., 2002, Wu et al., 2004).

1.7.2. Metabolismo da Glutathiona do SNC

Recentes estudos têm mostrado que a interação metabólica neurônio – astrócitos é responsável pela manutenção de glutathiona no cérebro. A deficiência de glutathiona no cérebro tem sido relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Em ratos neonatos a indução da deficiência de glutathiona por meio da inibição da primeira etapa da síntese de glutathiona – gama- glutamylcisteína sintetase (através da adição de butionina sulfoxamina – BSO) causou dano mitocondrial no cérebro (Dringer et al., 1999 c e d).

Dringen e colaboradores (1999c e d) afirmam que em culturas de neurônios na presença de astrócitos (co-cultura), o conteúdo de glutathiona tem um aumento considerável, indicando que as células astrogliais promovem o suporte de cisteína para a síntese de GSH neuronal através da redução intracelular de cistina e subsequente liberação de cisteína para os neurônios. A hipótese desses autores revela que o dipeptídeo cisteína-glutamil (CysGly) é um excelente precursor para a GSH neuronal. Os dados sugerem que os astrócitos geram este precursor por meio da ectoenzima γ -glutamyl transpeptidase . Figura 4.

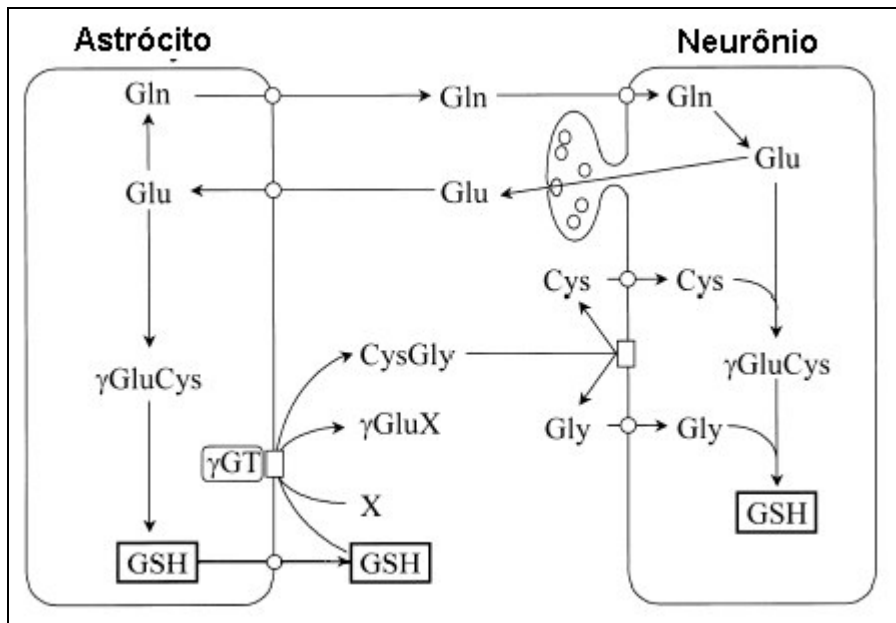


Figura 4. **Esquema ilustrativo da proposta de interação metabólica entre neurônio e astrócitos no metabolismo da glutatona.** A liberação de GSH das células astrogliais serve como substrato para a ectoenzima γ GT. O X representa um acceptor da porção γ -glutamil da GSH. CysGly, gerada pela reação catalisada pela γ GT, serve como precursor da GSH neuronal. Fonte: Adaptado de Dringen et al., 2000.

1.7.3. Efeitos da Desnutrição Sobre o Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a capacidade antioxidante podem ter um significativo efeito na patofisiologia da desnutrição protéica (Golden, 2002, Partadireja et al., 2005).

Baixas concentrações de GSH têm sido encontradas em situações de desnutrição protéica, estresse oxidativo e em outras condições patológicas (Wu et al., 2004).

Golden e Ramdath (1987) mostraram baixos níveis de glutatona na desnutrição protéica em humanos, embora as enzimas responsáveis pela manutenção da glutatona no estado reduzido, a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), 6-fosfogliconato desidrogenase (6PGD) e glutatona reductase, estivessem mais ativas do que em crianças normonutridas. Em resposta ao estresse oxidativo existe um aumento da atividade da G6PD e

6PDG a fim de promover um aumento de NADPH para a redução da glutathiona. Quando este suprimento está adequado, níveis de NADPH são mantidos; quando a taxa de oxidação de glutathiona excede a capacidade de seus equivalentes redutores, os níveis de NADPH diminuem apesar do aumento das enzimas redutoras.

Mais recentemente, Fechner e colaboradores (2001) encontraram redução do estado antioxidante no sangue, redução da glutathiona eritrocitária e aumento das concentrações plasmáticas de óxido nítrico em pacientes com kwashiorkor.

O efeito de restrição de proteína (0,5% de proteína) em camundongos por 3 semanas não alterou a relação GSH/GSSG em cérebro e rim, mas houve redução em fígado, coração e pulmões (Li et al., 2002).

Bonatto e colaboradores (2005) mostraram significativas alterações da atividade da SOD, lipoperoxidação e oxidação de proteínas em hipocampo de ratos de 21 e 75 dias que receberam restrição protéica (8% de caseína).

1.8. Metabolismo do Glutamato no SNC

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e está envolvido em muitas funções cerebrais, como: cognição, memória e aprendizado. Também se destaca por sua importância durante o desenvolvimento do SNC, promovendo a indução e eliminação de sinapses, migração, diferenciação e morte celular (Danbolt, 2001; Meldrum, 2000; Ozawa et al., 1998; Castellano et al., 2001, Segovia et al., 2001). Este neurotransmissor é sintetizado em neurônios glutamatérgicos a partir de glutamina por ação da enzima glutaminase e de α -cetoglutarato via glutamato

desidrogenase e α -cetoglutarato aminotransferases. O glutamato sintetizado é armazenado num "pool" vesicular através da ação de transportadores vesiculares independentes de Na^+ , presentes nas membranas das vesículas sinápticas. Quando ocorre a despolarização dos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos, o glutamato que se encontra nas vesículas é liberado para a fenda sináptica, por exocitose dependente da concentração de cálcio citosólico (Nicholls e Attwell, 1990, Vesce et al., 1999).

Diferentes subtipos de receptores de glutamato podem mediar sua ação em células pós-sinápticas. Os receptores de glutamato ionotrópicos (NMDA e não NMDA, como AMPA e Cainato^+), caracterizam-se por canais iônicos que permeiam cátions através da membrana celular. A ativação desses receptores provoca a despolarização da membrana sináptica e desencadeia uma resposta excitatória. Os receptores metabotrópicos estão associados a sistemas de segundos mensageiros intracelulares (Conn e Pinn, 1997) e são acoplados a proteínas G (proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina) modulando a atividade de efetores intracelulares, tais como adenilato ciclase e fosfolipase C, responsáveis pela produção de segundos mensageiros (AMPc, diacilglicerol e inositol)

Após a promoção de influxo iônico nas células pós-sinápticas e a modulação da produção de segundos mensageiros, o glutamato é removido da fenda sináptica por sistemas de transporte dependentes de sódio, localizados principalmente em células gliais. Os transportadores de glutamato são os seguintes: GLAST/EAAT1 (Storck et al., 1992), GLT-1/EAAT2 (transportadores gliais) (Pines et al., 1992), EAAC1/EAAT3 (transportador neuronal) (Kanai e Hediger, 1992), EAAT4 (transportador predominante em células de Purkinje no

cerebelo) (Fairman et al., 1995) e EAAT5 (transportador encontrado na retina) (Arriza et al., 1997, Danbolt, 2001). Devido à ausência de sistemas enzimáticos de degradação do glutamato na fenda sináptica, os sistemas de captação de glutamato são responsáveis pela inativação da ação glutamatérgica.

Os astrócitos são as principais células do SNC, responsáveis pela captação de glutamato após a liberação deste pelos neurônios. Os transportadores gliais (GLAST e GLT-1) estão principalmente envolvidos na captação e remoção do excesso de glutamato no meio extracelular evitando, assim, eventos de excitotoxicidade (Gegelashvili et al., 2001; Daikhin e Yudkoff, 2000).

Após a captação pelos astrócitos, o glutamato participa de diversas vias metabólicas (Had- Aissouni et al., 2002) (Figura 5):

- a) Pode ser convertido em glutamina pela enzima glial dependente de ATP, glutamina sintetase. A glutamina liberada pelos astrócitos é captada pelos neurônios, onde é transformada novamente em glutamato pela enzima glutaminase. Este ciclo, conhecido como ciclo glutamato - glutamina é uma forma de reciclar o glutamato e estabelece uma comunicação entre neurônios e astrócitos (Erecinska e Silver, 1990);
- b) O Glutamato também pode entrar no ciclo de krebs após sua conversão para α -cetoglutarato, participando da produção de energia e/ou síntese de outros metabólitos como o lactato. O

lactato é, então disponibilizado para os neurônios e participa do ciclo de krebs destas células (Westergaard et. al., 1995);

- c) Pode ser incorporado em diversos peptídeos e proteínas. Está envolvido na geração do tripeptídeo antioxidante, GSH, importante na neutralização dos radicais livres como mencionado anteriormente. O transporte de glutamato para o interior dos astrócitos é considerado uma importante proteção contra os efeitos do estresse oxidativo também para os neurônios. A síntese de glutathione é dependente do pool de glutamato disponível, assim a concentração intracelular de glutamato é um fator limitante para a síntese de glutathione em astrócitos (Dringen et al., 2000).
- d) As concentrações de glutamato intra e extracelular mediam sistemas de captação e liberação de cistina/cisteína, conforme mencionado a seguir. Estes sistemas podem suprir a célula de cisteína, precursor limitante para a síntese de glutathione (Dringen et al., 2000; Had- Aissouni et al., 2002).
- e) O transporte de glutamato estimula a atividade do transportador de glicose pela enzima sódio potássio ATPase. Tal ativação supre os astrócitos de glicose (Pellerin e Magistretti, 1994; Pellerin et al., 1998).

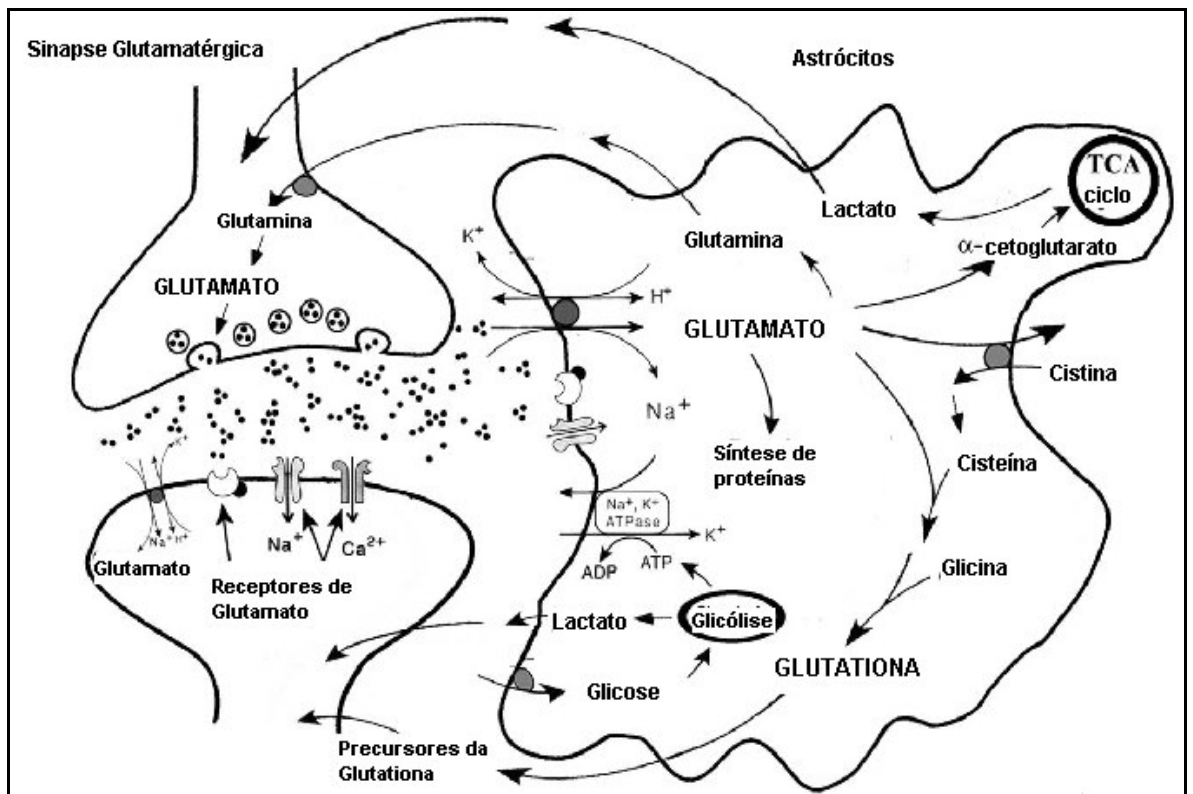


Figura 5. Esquema ilustrativo das vias metabólicas após a captação de glutamato pelos astrócitos. Fonte: Adaptado de Had- Aissuoni et al., 2002.

1.8.1. Excitotoxicidade do Glutamato

Está bem demonstrado que altas concentrações de glutamato extracelular pode induzir à morte de neurônios, oligodendrócitos e até mesmo astrócitos. Diversos mecanismos são propostos para tal efeito, o aumento de Ca^{2+} intracelular causado pelo estímulo excessivo de seus receptores ionotrópicos e metabotrópicos leva ao desencadeamento de uma cascata de eventos intracelulares que incluem um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, maior influxo de cálcio e sódio e aumento do consumo de energia, culminando na morte neuronal (Sattler e Tymianski, 2000). A toxicidade do glutamato foi associada à diminuição no conteúdo de glutatona, estresse oxidativo e posterior morte celular. O glutamato pode inibir a captação de cistina por diferentes sistemas de transporte (Had- Aissuoni et al., 2002). O

principal sistema transporta cistina para o interior do astrócito na troca por glutamato, conhecido como sistema x_c^- (Danbolt, 2001) . Alterações neste sistema devem-se a elevação das concentrações de glutamato extracelular. Mais recentemente foi demonstrado um sistema de captação de cistina pelo transportador dependente de sódio (X_{AG}^-) (Allen et al, 2001), que é estimulado por baixas concentrações de glutamato extracelular. Assim, altas concentrações extracelulares de glutamato inibem este transporte.

1.8.2. Efeitos da desnutrição sobre alguns Parâmetros Glutamatérgicos

Recentes estudos desenvolvidos por nosso grupo mostraram que ratos de 25 dias expostos à restrição protéica (7% de caseína) pré e pós-natal apresentaram maior sensibilidade à ação convulsivante da picrotoxina (bloqueador do canal de Cl^- do receptor gama-aminobutírico do tipo A - $GABA_A$) e menor sensibilidade à ação convulsivante do ácido quinolínico (composto endógeno produzido pelo metabolismo do triptofano, que pode estimular em excesso o sistema glutamatérgico). O grupo desnutrido apresentou, ainda, aumento da captação de GABA por fatias de córtex e hipocampo, diferença não obtida quanto à captação do glutamato (Schweigert et al., 2005). A menor sensibilidade à ação convulsivante do ácido quinolínico também foi mostrada por Rotta e colaboradores (2003), em animais desnutridos de 75 dias, indicando que este insulto nutricional não é revertido pela idade.

Ainda em estudos desenvolvidos em nosso laboratório, mostramos que a desnutrição pré e pós-natal alterou alguns parâmetros do sistema glutamatérgico em ratos de 21 e 75 dias, reduzindo a união específica (binding) Na^+ - independente de glutamato em membrana plasmática cortical. E em ratos

desnutridos de 21 dias foi mostrada uma reduzida captação vesicular de glutamato (Rotta, 2003).

Tonkiss e colaboradores (1998) mostraram evidências de que os sistemas excitatórios podem ser alterados em ratos expostos à restrição protéica pré-natal. Estes ratos mostraram uma aumentada sensibilidade ao MK-801, um bloqueador de canal do receptor NMDA. Em estudo recente, Fiacco e colaboradores (2003) observaram um aumento na densidade de receptores hipocampais de cainato em ratos adultos desnutridos a partir do período pré-natal (mas não em ratos jovens), porém densidade normal de receptores NMDA e AMPA. Estes resultados sugerem que o aumento na densidade de receptores de cainato pós-sinápticos pode ser compensatório à diminuída liberação de glutamato devido à redução das fibras musgosas hipocampais relatado em ratos desnutridos por Cintra e colaboradores (1997). Esta seletividade na compensação em ratos adultos poderia ajudar a assegurar a sobrevivência, mesmo em condições adversas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre alguns parâmetros bioquímicos gliais e de estresse oxidativo, durante o desenvolvimento do SNC de ratos.

2.2. Objetivos Específicos

1. Investigar o efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre a ontogenia de marcadores gliais (GFAP e S100B) em ratos de 2, 15 e 60 dias em córtex cerebral, hipocampo, cerebelo;
2. Avaliar o efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre a ontogenia da S100B no líquor de ratos de 21 e 60 dias;
3. Estudar o efeito da desnutrição pré e pós-natal sobre a atividade da glutamina sintetase e captação de glutamato em córtex cerebral e hipocampo de ratos de 2, 15 e 60 dias;
4. Verificar o efeito da desnutrição pré e pós-natal sobre parâmetros de estresse oxidativo, denominados: conteúdo de glutathiona, reatividade antioxidante total, atividade de enzimas antioxidantes, dano em macromoléculas (lipoperoxidação e oxidação de resíduos tirosina e triptofano) e conteúdo de radicais livres em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos de 2 e 60 dias.

PARTE II

Artigo 1

Título: Developmental changes in brain content of glial fibrillary acidic and S100B proteins in rats exposed to protein malnutrition.

Autores: Ana Maria Feoli, Marina C Leite, Ana Carolina Tramontina, Mariane Silva, Francine Tramontina, Carmem Gottfried, Marcos Luiz Perry, Carlos-Alberto Gonçalves.

Artigo em preparação a ser submetido ao periódico “Developmental Brain Research”.

Developmental changes in content of glial fibrillary acidic and S100B proteins in rats exposed to protein malnutrition

Ana Maria Feoli ^{1,2}, Marina C Leite, Ana Carolina Tramontina¹, Mariane Silva¹, Francine Tramontina¹, Carmem Gottfried¹, Marcos Luiz Perry¹, Carlos-Alberto Gonçalves^{1*}.

¹ Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Pages = 21

Figures = 04 ; Tables = 01

* Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Departamento de Bioquímica, ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ramiro Barcelos, 2600-Anexo

90035-003

Porto Alegre, RS, Brazil

casq@ufrgs.br

Abstract

Prenatal and early postnatal protein malnutrition adversely affects the developing brain in numerous ways, but only a few studies are available regarding specific glial parameters. This study aimed to evaluate specific glial commitment of rats exposed to pre and postnatal protein malnutrition based on glial fibrillary acid protein (GFAP) and S100B immunocontents in cerebral cortex, hippocampus, cerebellum and cerebrospinal fluid, on the 2nd, 15th and 60th postnatal days. We found an increase in GFAP in all these regions on the 2nd postnatal day, however a significant decrease in GFAP in hippocampus and cerebellum was seen on the 15th postnatal day. An increase in S100B was also observed in all regions only on the 2nd postnatal day. No changes in the brain contents of GFAP and S100B were found for these proteins on the 60th postnatal day in malnourished rats. Cerebrospinal fluid S100B levels, however, which were elevated early on remained elevated on the 60th postnatal day. Our data support the concept of precocious astrogliogenesis at birth and delayed postnatal astrocytogenesis induced by protein malnutrition. Specific astrocytic alterations in hippocampus and cerebellum emphasize the regional brain vulnerability to malnutrition, possibly associated with intense postnatal neurogenesis and synaptogenesis of these regions. These alterations are transitory; however, the persistent elevated extracellular S100B levels in adult rats suggest some brain damage or a risk of brain diseases.

Section: Nervous System Development, Regeneration and Aging

Key words: astrocyte; GFAP; protein malnutrition; S100B

1. INTRODUCTION

Malnutrition is an important and very common insult to human brain development and function. The global prevalence of stunting in < 5-years-old children associated with undernourishment, particularly protein restriction, is increasing despite the decline in childhood mortality [1]. Prenatal and early postnatal protein malnutrition adversely affects the developing brain in numerous ways, depending largely on its timing in relation to various developmental events in the brain and, to a lesser extent, on the type and severity of the deprivation [14].

Several studies show the biochemical changes in the central nervous system (CNS) in experimental models of protein malnutrition, particularly involving specific neurotransmitter systems [17,21,27]. More recently, we have shown changes in the neurotransmission mediated by glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the CNS [19]. Surprisingly, only a few studies are available regarding specific glial parameters [7], despite the growing evidence for the importance of glial cells for neuronal development, survival and plasticity. In fact, during CNS development the generation of cell types occurs sequentially, and neurons are predominantly generated before glial cells [20]. Delayed or precocious glial differentiation may cause severe disorganization and dysfunction of the CNS [9]. Glial cells, particularly astrocytes, are involved in the metabolic support of neurons, glutamate uptake, secretion of neurotrophic factors and antioxidant defense [22].

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a specific marker of mature astrocytes. CNS injuries are commonly accompanied by astrogliosis, characterized by an increase in GFAP [16]. On the other hand, reduction of GFAP during prenatal

development induced by protein restriction has been associated with delayed astrocytogenesis [8]. S100B protein is another useful marker of brain injury, expressed and secreted by astrocytes [4] and a lower content of S100 protein (possibly S100B) has been found in the cerebellum of undernourished rats [2].

This study aimed to evaluate glial commitment of rats exposed to protein malnourishment based on GFAP and S100B immunoccontent on the 1st, 15th and 60th post-natal days in different brain regions: cerebral cortex, hippocampus and cerebellum, as well as S100B content in cerebrospinal fluid.

2. RESULTS

Rats were submitted to prenatal and postnatal protein malnutrition. The severity of the protein malnutrition model was evaluated by observing the body and brain weight reduction on the 2nd, 15th and 60th postnatal days (Fig 1). A very strong reduction in brain weight was observed for all ages, being approximately 18% on the 2nd postnatal day and 30% on the 60th postnatal day (Fig 1B). Body weight reduction was still more intense (Fig 1A).

A developmental increase in GFAP was observed in all brain structures, in both normal and malnourished animals (Fig 2). On the 2nd postnatal day, a higher content of GFAP (approximately 50%) was found in the cerebral cortex (Fig 2A), hippocampus (Fig 2B) and cerebellum (Fig 2C) of malnourished rats. In cerebral cortex, an increase of 15% persists on the 15th postnatal day. Interestingly, on the 15th post-natal day we found a reduced content of GFAP in hippocampus and cerebellum (approximately 30 and 20%, respectively). No significant alterations in

GFAP content in any of the brain structures of malnourished animals were observed on the 60th postnatal day.

Similarly to GFAP, a developmental increase in S100B was observed in all brain structures, in both normal and malnourished animals (Fig 3). It should be noted that we used two scales of values of S100B (in ng/ μ g protein) in the graphs; we found an increase in S100B in cerebral cortex (Fig 3A), hippocampus (Fig 2B) and cerebellum (Fig 3C) on the 2nd postnatal day. An increase in S100B was still seen in the cerebral cortex on the 15th postnatal day in malnourished rats, but not in hippocampus or cerebellum. No significant changes were observed on the 60th post-natal day.

In cerebrospinal fluid, we observed an increase (about 67%, $p= 0.017$) in S100B content in malnourished rats on the 21st postnatal day (Fig. 4). An ontogenetic decrease is observed in both groups on the 60th postnatal day, however, the difference between the control and malnourished rats is greater (about 130%, $p=0.015$). It should be mentioned that we were not able to collect CSF without injury (indicated by blood contamination) in malnourished rats before the 21st postnatal day.

3. DISCUSSION

Regardless of the progress in reducing global infant mortality, fetal and early postnatal protein malnutrition is still a challenge for public health in the developing world, a situation that demands additional efforts to investigate biochemical changes and risks for chronic diseases. Early nutritional deficiencies,

even when transient, may affect long-term disease risk, possibly by modifying cellular differentiation and/or function at critical stages of development [1].

Twenty-five years ago a study showed that pre and postnatal malnutrition in rats reduced proliferation of neuronal and glial cells [7], in agreement with many other results describing lower brain weight in malnourished animals. We found augmented GFAP in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of malnourished rats on the 2nd postnatal day. In the same vein, we found that S100B content was also increased in malnourished rats on the 2nd postnatal day in all brain regions. In contrast, another study showed a decrease in GFAP immunostaining in the cerebral cortex of rats on the 2nd postnatal day following exposure to protein restriction during just the first two weeks of gestation [8]. GFAP and S100B are markers of astrocytic maturity, during development. Therefore, our findings could be due to an increase in the immunoreactivity of these astrocytic proteins by cell maturation rather than an increase in astrocyte population. In other words, prenatal protein malnutrition may be caused a precocious maturation of astrocytes. It is important to mention that precocious glial maturation would be accompanied by an interruption of neuronal generation [9, 20]. The different ontogenetic profiles of these proteins in malnourished rats, when comparing hippocampus/cerebellum and cerebral cortex, was possibly due to the different profile of glial and neuronal postnatal proliferation and differentiation in these brain regions [7, 15].

On the other hand, after injury of the CNS, either as a result of trauma, disease, genetic disorders, or chemical insult, astrocytes become reactive and this reactivity, termed astrogliosis, is characterized by an increase in GFAP [5, 16].

Therefore, another possible explanation would be to interpret the increase of GFAP as an astrogliosis. From this point of view, protein malnutrition would cause alterations equivalent to other insults cited above during prenatal brain development. The question remains as to which process, precocious astrocyte maturation or astrogliosis, is more plausibly triggered by protein malnutrition during prenatal development.

During brain development neurons and glia are generated in a sequential manner. The JAK-STAT 1/3 pathway has been postulated to regulate later onset of astrogliogenesis [9]. Interestingly, in hepatocytes, activation has been observed in the JAK-STAT 3 pathway following induction by protein malnutrition [12].

We found a large decrease in GFAP immunoreactivity in malnourished rats on the 15th postnatal day, a stage at which astrocytogenesis would be associated with an intense cell granule proliferation in rodents, particularly in hippocampus and cerebellum [15]. In addition, another study showed a decrease in GFAP (measured by immunocytochemistry) on the 30th and 60th postnatal days, particularly in the suprachiasmatic nucleus, induced by a multi-deficient diet [13].

In contrast, in cerebral cortex, the increase in GFAP and S100B at birth persisted on the 15th postnatal day. No changes were observed in S100B at this age in cerebellum and hippocampus following protein malnutrition. Together, these data suggest the glial heterogeneity in the brain should be considered; it is possible that the changes in S100B and GFAP contents could be due to differences in the manner in which protein malnutrition affects different populations of astrocytes and molecular targets. In fact, although GFAP and

S100B are astrocyte markers they have different brain distributions and distinct putative roles.

Considering the putative role of S100B in synaptogenesis [4, 25] we can speculate that, in malnourished rats, hippocampal and cerebellar neurons are less affected than cerebral cortex. Elevated content of S100B in cerebral cortex could impair neuronal survival. However, the S100B increase in cerebral cortex does not correspond necessarily to an increase in the extracellular levels of this protein in this tissue. In fact, distinct intra and extracellular changes in S100B levels have been reported during postnatal development and in astrocyte culture [5], indicating that the extracellular level does not necessarily reflect the intracellular content.

Several studies have demonstrated the existence of a positive relationship between injury to the CNS and S100B levels in CSF [18]. In agreement with these findings and with the idea of nutritional injury, we have found an early and persistent increase in CSF S100B in malnourished rats. Elevation in CSF S100B is possibly secondary to the variation of this protein in a determined brain region, such as cerebral cortex, which exhibited an elevated content of S100B on the 2nd and 15th postnatal days. However, elevated levels of S100B have been more associated with an astrocyte activation corresponding to astrogliosis.

Again, a developmental explanation appears to be more suitable. The CSF S100B increase is possibly due to delayed glial maturation in malnourished rats. In fact, a developmental decrease in CSF S100B between postnatal days 15 and 60 was observed in normal rats [Fig 4; 23]. Malnourished rats exhibited this ontogenetic decrease, but CSF S100B was persistently more elevated than control rats. It may be speculated that delayed postnatal astrocytogenesis in

hippocampus and cerebellum (based on GFAP reduction) is accompanied by a higher S100B secretion activity, as observed in cultured astrocytes [23]. However, a direct and specific effect of protein malnutrition on extracellular S100B cannot be ruled out, as observed in ketogenic fed rats [28] and astrocyte cultures treated with β -hydroxy-butyrate [11].

In summary, these data indicate a significant astrocyte biphasic commitment in rats induced by protein malnutrition that could, in turn, affect neuronal development, survival and plasticity. GFAP and S100B data support the concept of precocious astrogliogenesis at birth and delayed postnatal astrocytogenesis at an age corresponding to the peak of synaptogenesis in rodents induced by nutritional insult due to a protein restriction. Specific alterations in hippocampus, cerebellum and cerebral cortex emphasize the regional brain vulnerability to malnutrition. Another interesting aspect is the recovery (based on GFAP and S100B brain content) observed in adult rats. However, the persistent elevated extracellular levels of S100B, together with some signals of oxidative damage [6], reinforce the idea of brain damage or risk to brain diseases.

4. EXPERIMENTAL PROCEDURE

Material. Sodium carbonate, barbital, albumin, Tween-20, EGTA, PMSF, o-phenylenediamine and monoclonal anti-S100B antibody were purchased from SIGMA, USA. Anti-S100 antibody conjugated with peroxidase and anti-GFAP antibody were from DAKO, USA. Maxisorp microtiter plates were from NUNC.

Animals and protein malnutrition protocol. Male Wistar rats from our breeding colony were used. Prenatal and lactational malnutrition was induced in pups by

restricting the protein content of the mother's diet to 7% (Table 1) during the entire gestation and lactation periods (when the malnutrition was produced by decreasing the global amount of nutrients accessible by the pups), whereas additional malnutrition until 60 days old was induced by maintaining the same 7% protein diet. The litter size was adjusted to eight pups per mother on the first postnatal day. Animals were maintained at 22°C, on a 12-h light/12-h dark cycle until the experimental age. The protocol concerning this research was used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Brazil [3].

Brain tissue and CSF samples. Rats were anaesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (50 mg/kg body weight) and positioned in a stereotaxic apparatus. Cerebrospinal fluid was obtained by cisterna magna puncture using a 0.33 mm diameter needle that was inserted no more than 1.5 mm and a maximum volume of 30 µL was collected in a 3 min period to minimize risk of brainstem damage. CSF samples were frozen (- 70 °C) until further analysis. After decapitation, the brain was dissected and cut into 0.4 mm slices with a McIlwain chopper. Microslices (1 mm in diameter) were obtained from hippocampus, cerebellum and cerebral cortex with a stainless steel punch. Brain slices were homogenized in PBS, pH 7.4, containing 1 mM EGTA and 1 mM PMSF and stored at -70°C [23].

Quantification of S100B and GFAP. S100B content in CSF and brain tissue was measured by ELISA, as described previously [24, 26]. Briefly, 50 µL of sample plus 50 µL of barbital buffer were incubated for 3 h on a microtiter plate previously

coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1, from Sigma). Peroxidase-conjugated anti-S100 (from DAKO) was then incubated for 1 h. A colorimetric reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.025 to 2.5 ng/mL. Protein was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as a standard. ELISA for GFAP was carried out by coating the microtiter plate with 100 μ L samples containing 30 μ g of protein for 48 h at 4°C. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit (DAKO) for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1h, at room temperature; the standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL.

Statistical Analysis. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Difference between malnourished and control groups in each age were analyzed statistically using the Student's *t* test, with the level of significance set at $p < 0.05$. ANOVA was used to characterize the ontogenetic profile of control and malnourished rats.

Acknowledgements: Brazilian funds from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERENCES

1. Caballero, B., 2002. Global patterns of child health: the role of nutrition. *Ann Nutr Metab.* 46, 3-7.
2. Clos, J., Legrand, C., Legrand, J., Ghandour, M.S., Labourdette, G., Vincendon, G., Gombos, G., 1982. Effects of thyroid state and undernutrition on S100 protein and astroglial development in rat cerebellum. *Dev Neurosci.* 5, 285-292.
3. de Souza, K.B., Feoli, A.M., Kruger, A.H., de Souza, M.R., Perry, C.T., Rotta, L.N., Souza, D.O., Perry, M.L., 2004. Effects of undernutrition on glycine metabolism in the cerebellum of rats. *Ann Nutr Metab.* 48, 246-250.
4. Donato, R., 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 637-668.
5. Eng, L.F., Ghimikar, R.S., Lee, Y.L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25, 1439-1451.
6. Feoli, A.M., Siqueira, I.R., Almeida, L., Tramontina, A.C., Vanzella, C., Sbaraini, S., Schweigert, ID., Netto, C.A., Perry, M.L.S., Gonçalves, C.A., 2006. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition.* 22, 160-165.
7. Giuffrida, A.M., Hamberger, A., Serra, I., Geremia, E., 1980. Effects of undernutrition on nucleic acid synthesis in neuronal and glial cells from different regions of developing rat brain. *Nutr Metab.* 24, 189-198.

8. Gressens, P., Muaku, S.M., Besse, L., Nsegbe, E., Gallego, J., Delpech, B., Gaultier, C., Evrard, P., Ketelslegers, J.M., Maiter, D., 1997. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Dev Brain Res.* 103, 21-35.
9. He F., Ge W., Martinowich K., Becker-Catania S., Coskun V., Zhu W., Wu H., Castro D., Guillemot f., Fan G., de Vellis J., Sun YE., 2005. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat Neurosci.* 8, 616-625.
10. Horwitz, W., 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Washington, DC.
11. Leite, M., Frizzo, J.K., Nardin, P., de Almeida, L.M., Tramontina, F., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2004. Beta-hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res Bull.* 64, 139-143.
12. Ling P.R., Smith R.J., Kie S., Boyce P., Bistran BR., 2004. Effects of protein malnutrition on IL-6-mediated signaling in the liver and the systemic acute-phase response in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287, 801-808.
13. Mendonça J.E., Vilela M.C., Bittencourt H., Lapa R.M., Oliveira F.G., Alessio M.L., Guedes R.C., De Oliveira M.S., Da Costa B.L., 2004. GFAP expression in astrocytes of suprachiasmatic nucleus and medial preoptic area are differentially affected by malnutrition during rat brain development. *Nutr Neurosci.* 7, 223-234.

14. Morgane P.J., Austin-LaFrance R., Bronzino J., Tonkiss J., Dias-Cintra S., Cintra L., Kemper T., Galler J.R., 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 17, 91-128.
15. Morgane P.J., Mokler D.J., Galler J.R., 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev.* 26, 471-483.
16. O'Callaghan, J.P., 1991. Assessment of neurotoxicity: use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomed Environ Sci.* 4, 197-206.
17. Rocha, J.B., Souza. D.O., 1994. Effects of undernutrition during suckling and early post-weaning on the inhibition by met-enkephalin of striatal adenylate cyclase activity in adult rats. *Pharmacol Toxicol.* 75, 321-323.
18. Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J.H., Arolt, V., 2003. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 60, 614-632.
19. Rotta, L.N., Schmidt, A.P., Mello e Souza, T., Nogueira, C.W., Souza, K.B., Izquierdo, I.A., Perry, M.L., Souza, D.O., 2003. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem Res.* 28, 1181-1186.
20. Sauvageot O.M., Stiles C.D., 2002. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 12, 244-249.
21. Steiger, J.L., Alexander, M.J., Galler, J.R., Farb, D.H., Russek, S.J., 2003. Effects of prenatal malnutrition on GABAA receptor alpha1, alpha3 and beta2 mRNA levels. *Neuroreport.* 14, 1731-1735.
22. Takuma, K., Baba, A., Matsuda, T., 2004. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 72, 111-127.

23. Tramontina, F., Conte, S., Gonçalves, D., Gottfried, C., Portela, L.V., Vinade, L., Salbego, C., Gonçalves, C.A., 2002. Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell Mol Neurobiol.* 22, 373-378.
24. Tramontina, F., Karl, J., Gottfried, C., Mendez, A., Goncalves, D., Portela, L.V., Gonçalves, C.A., 2000. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res Brain Res Protoc.* 6, 86-90.
25. Van Eldik, L.J., Wainwright, M.S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 21, 97-108.
26. Vicente, E., Bôer, M., Leite, M., Silva, M., Tramontina, F., Porciúncula, L., Dalmaz, C., Gonçalves, C.A., 2004. Cerebrospinal fluid S100B increases reversibly in neonates of methylmercury-intoxicated pregnant rats. *Neurotoxicology* 25, 771-777.
27. Wiggins, R.C., Fuller, G., Enna, S.J., 1984. Malnutrition and the development of brain neurotransmitter systems. *Life Sci.* 35, 2085-2094.
28. Ziegler, D.R., Oliveira, D.L., Pires, C., Ribeiro, L., Leite, M., Mendez, A., Gonçalves, D., Tramontina, F., Portela, L.V., Wofchuk, S.T., Perry, M.L., Gonçalves, C.A., 2004. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci Res.* 50, 375-379.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Body and brain weight of rats exposed to protein malnutrition (PMN).*

Rats were exposed to a 7% protein diet during pre and postnatal life. Weights were measured on the 2nd (P2), 15th (P15) and 60th (P60) postnatal days. Insets in A and B are body and brain weight, respectively, on the 2nd postnatal day. Values are mean \pm standard error of 6-8 rats in each group. * Significantly different from respective control ($p < 0.05$).

Figure 2. *GFAP content in brain tissue of rats exposed to protein malnutrition*

(PMN). Rats were exposed to a 7% protein diet during pre and postnatal life. Three brain regions were dissected out (cerebral cortex, hippocampus and cerebellum) and GFAP contents were analyzed by ELISA., on the 2nd , 15th and 60th postnatal days. Values are mean \pm standard error of 6-8 rats in each group. * Significantly different from respective control ($p < 0.05$).

Figure 2. *S100 content in brain tissue of rats exposed to protein malnutrition*

(PMN). Rats were exposed to a 7% protein diet during pre and postnatal life. Three brain regions were dissected out (cerebral cortex, hippocampus and cerebellum) and S100B contents were analyzed by ELISA on the 2nd , 15th and 60th postnatal days. Values are mean \pm standard error from 6-8 rats in each group. Notice two scales on the Y axis. * Significantly different from respective control ($p < 0.05$).

Figure 4. *S100B in cerebrospinal fluid of rats exposed to protein malnutrition (PMN).* Rats were exposed to 7% protein diet during pre and postnatal life. Cerebrospinal fluid was collected by cisterna magna puncture under anesthesia with thiopental, on the 21st and 60th postnatal days. S100B content was measured by ELISA. Values are mean \pm standard error of 8-10 rats in each group.

* Significantly different from control ($p < 0.05$).

Table 1. Nutritional Composition of the diets*

	25% protein diet (g/kg/diet)	7% protein diet (g/kg/diet)
Casein (87% protein)**	287	80.50
Fat (soybean oil)	150	150
Carbohydrate (corn starch)	501.5	708
Salt mix†	40	40
Vitamin mix‡	10	10
Non-nutritive fiber	10	10

* Salt and vitamin compositions are according to [10].

Energy for both diets: 4.3 kcal/g diet in both diets.

** Casein, purity 87% (from Farmaquímica, Porto Alegre, Brazil) supplemented with 0.15% L-methionine (from Merck, Rio de Janeiro, Brazil).

† Mineral mixture (from Roche, São Paulo, Brazil) mg/100 g of ration: NaCl, 557; KCl, 3.2; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄_7H₂O, 108; MnSO₄_H₂O, 16; ZnSO₄_7H₂O, 2.2; CuSO₄_5H₂O, 1.9; CaCl₂_6H₂O, 0.09.

‡ Vitamin mixture (from Roche, São Paulo, Brazil), mg/100g of ration: vitamin A, 4; vitamin D, 0.5; vitamin E, 10; menadione, 0.5; choline, 200; PABA, 10; inositol, 10; niacin, 4; pantothenic acid, 4; riboflavin, 0.8; thiamin, 0.5; pyridoxine, 0.5; folic acid, 0.2; biotin, 0.04; vitamin B12, 0.003.

Figure 1

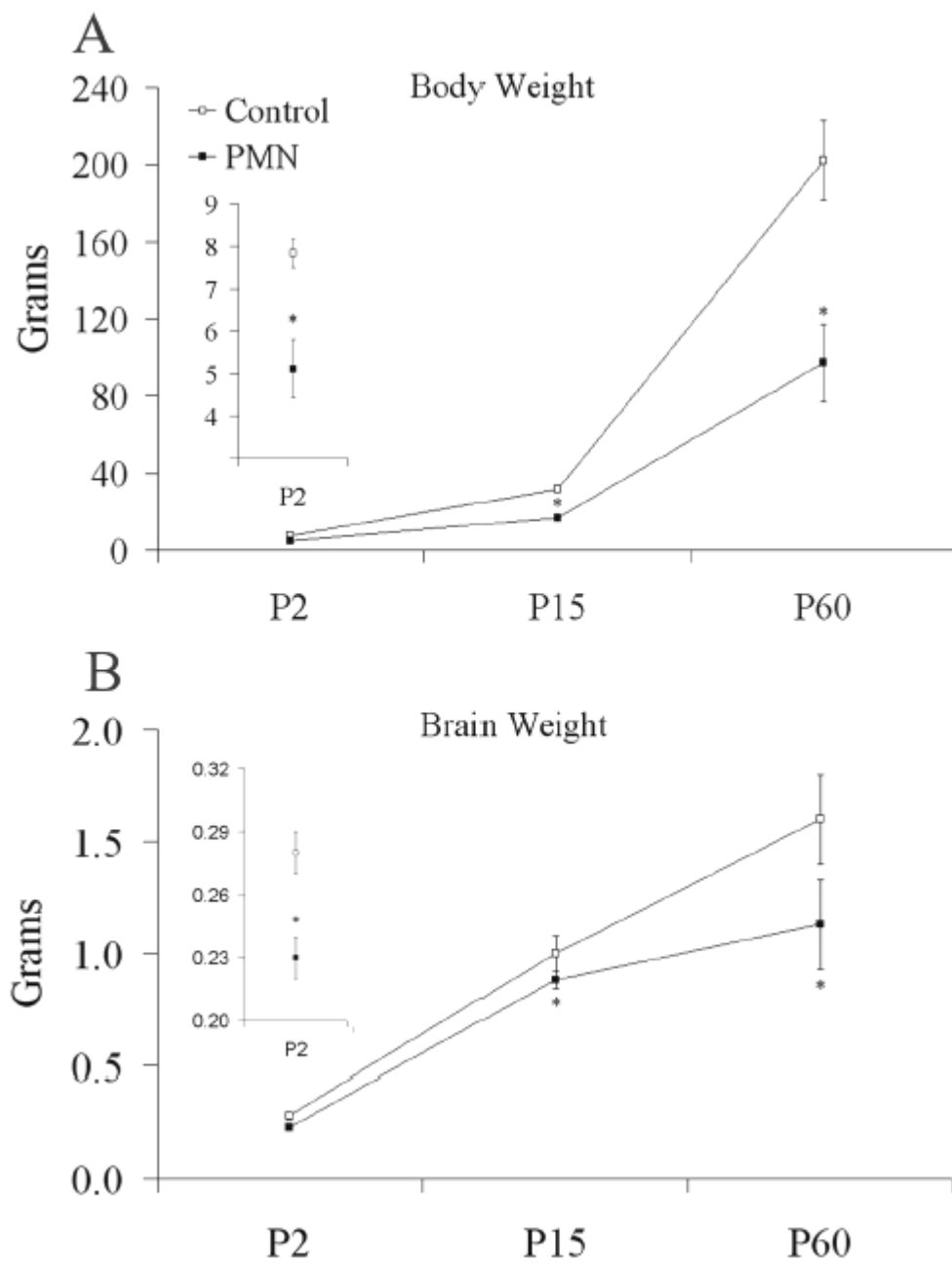


Figure 2

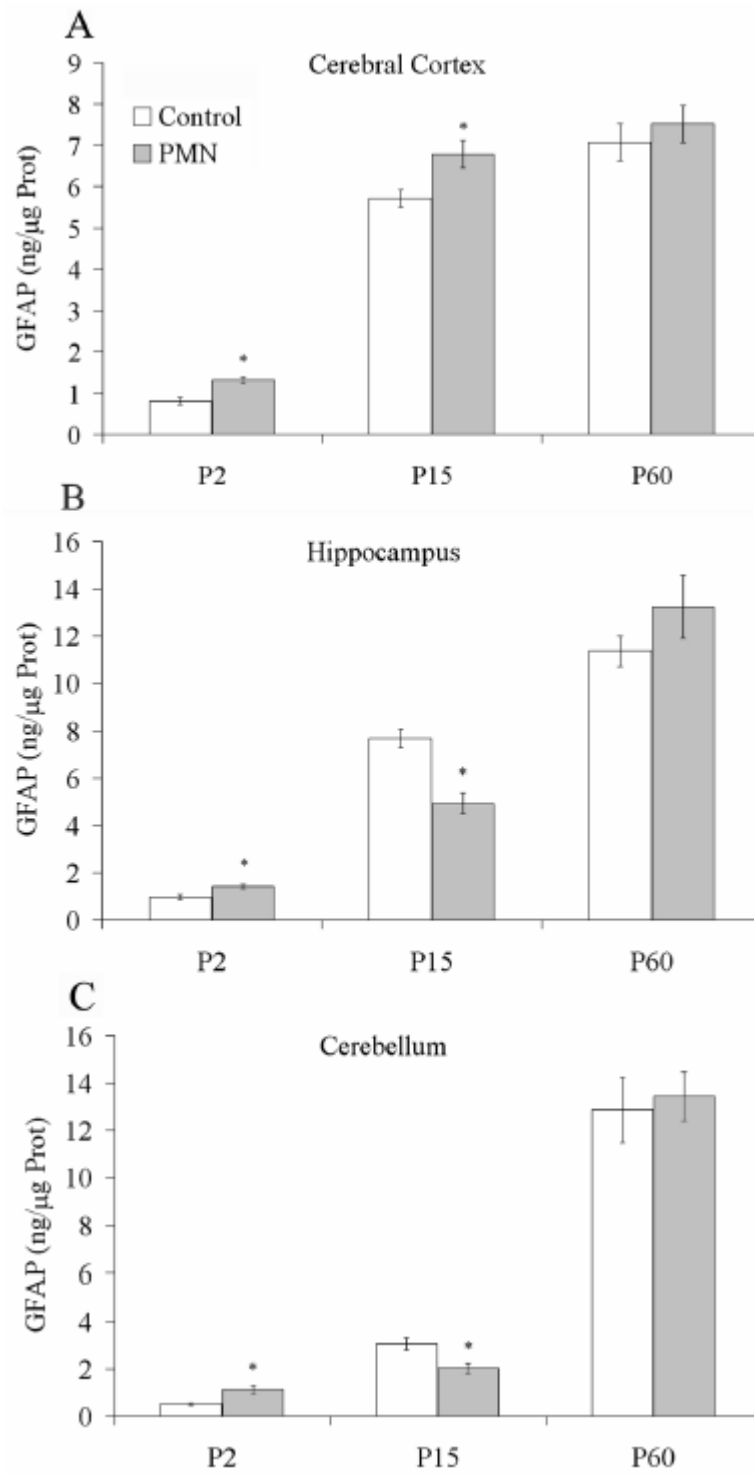


Figure 3

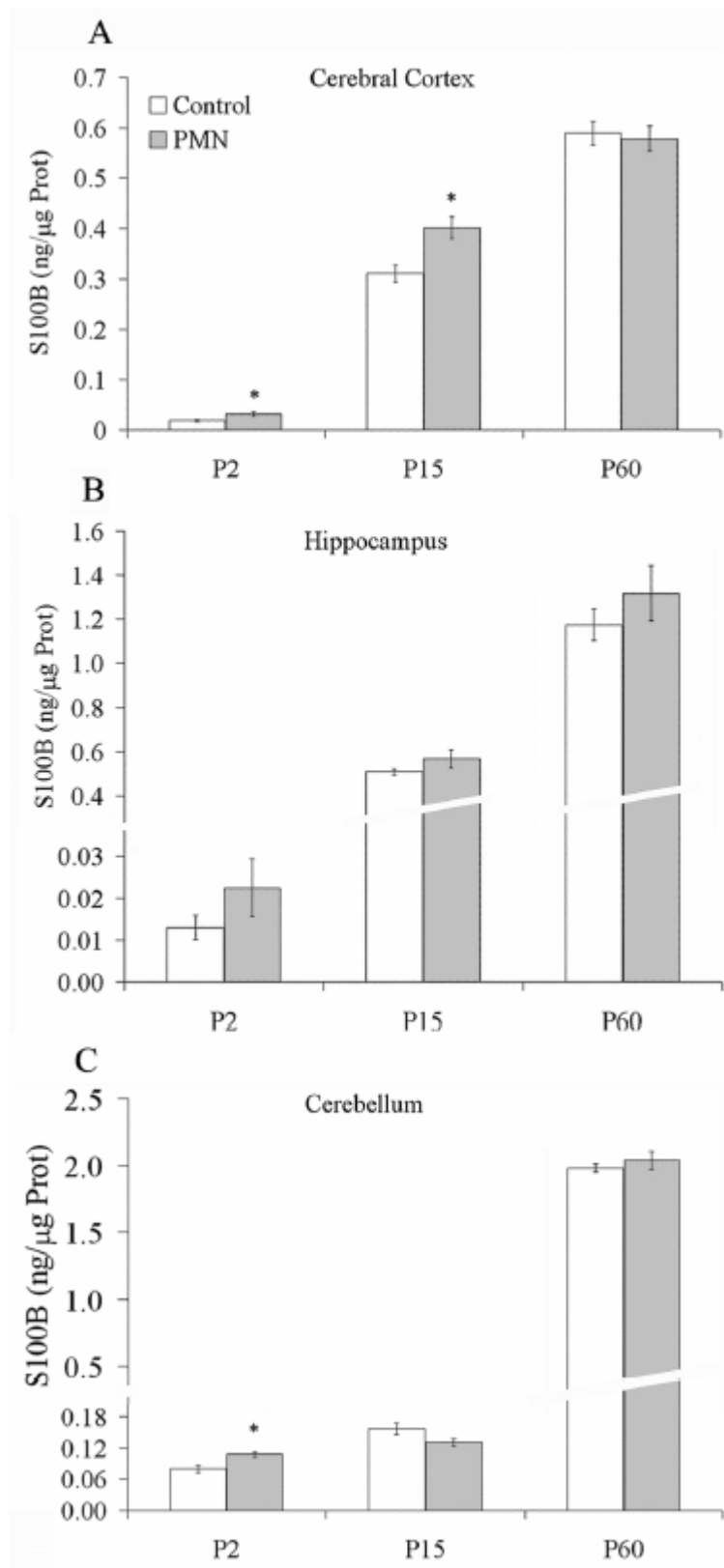
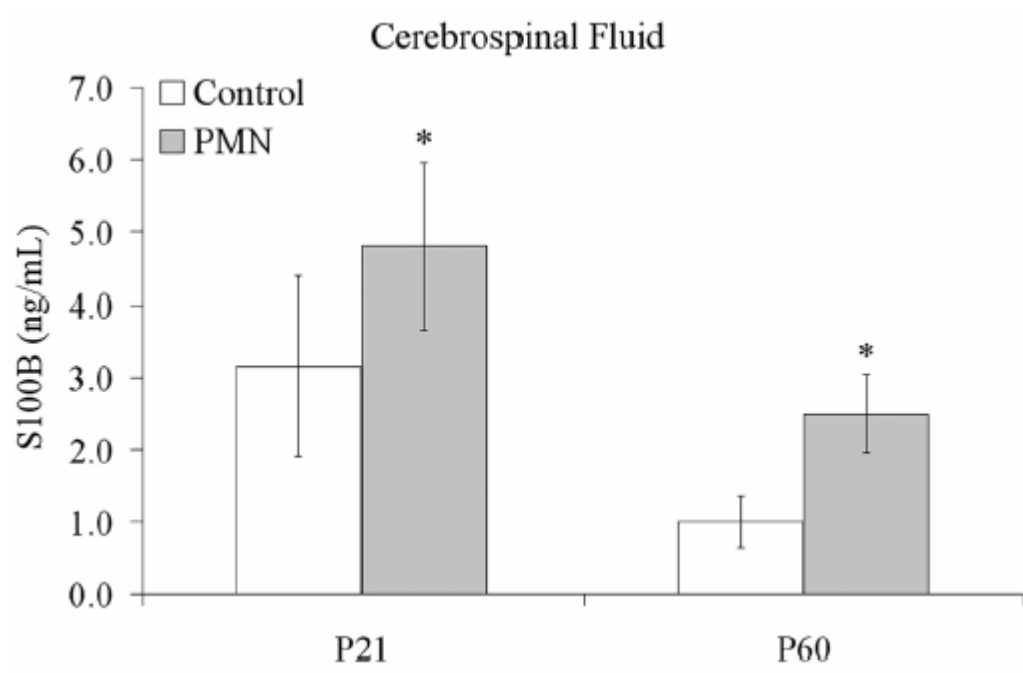


Figure 4



Artigo 2

Título: Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to protein malnutrition.

Autores: Ana Maria Feoli, Ionara Siqueira, Lucia Maria V. Almeida, Ana Carolina Tramontina, Cíntia Battu, Susana T. Wofchuk, Carmem Gottfried, Marcos Luiz Perry, Carlos-Alberto Gonçalves.

Artigo submetido ao periódico “Journal of Nutrition”.

Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to protein malnutrition^a

Ana Maria Feoli ^{1,3}, Ionara Siqueira², Lucia Maria V. Almeida³, Ana Carolina Tramontina³, Cíntia Battu³, Susana T. Wofchuk³, Carmem Gottfried³, Marcos Luiz Perry³, Carlos-Alberto Gonçalves^{3,b}.

¹ Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ² Departamento de Farmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ³ Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Words: 4671 Figures = 05; Tables = 01

Running title: Brain glutathione & protein malnutrition

^a Supported by Brazilian funds from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

^b Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves (E-mail: casg@ufrgs.br)

Departamento de Bioquímica, ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, 90035-003
Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

The brain is particularly susceptible to oxidative insults and its antioxidant defense is dependent on its glutathione content, especially during development. Protein malnutrition is an important and very common insult during development and compromises antioxidant defense in the body, particularly glutathione levels. It is possible that the brain content of glutathione and related metabolic pathways predominantly played by astrocytes (particularly glutamate uptake and glutamine synthesis) could be altered by protein malnutrition. In this study, we measured glutathione content, glutamine synthetase activity and glutamate uptake activity in three brain regions (cerebral cortex, hippocampus and cerebellum) of rats submitted to pre and postnatal protein malnutrition. Although malnourished rats exhibited a similar ontogenetic profile of glutathione levels in brain tissue, they had lower levels on the 2nd and 15th postnatal days. In addition, we found other changes such as reduced TAR and glutathione peroxidase activity on the 2nd postnatal day, these were not accompanied by alterations in free radical levels and lipoperoxidation. Moreover, elevated activity of glutamine synthetase and reduced glutamate uptake activity were also found in malnourished rats. Taken together, these alterations indicate specific changes in astrocyte metabolism, possibly responsible for a higher vulnerability to excitotoxic/oxidative damage in malnourished animals. The lower antioxidant defense appears to be the main alteration that causes oxidative imbalance rather than an increase of reactive oxygen species. Moreover, a recovery of altered metabolic parameters may be observed during adulthood, despite the persistent protein malnutrition insult; other and lasting alterations should not be rule out, however.

Key words: brain development, glutathione, glutamate uptake, protein malnutrition

Introduction

Cellular glutathione is the major antioxidant compound that acts both directly to remove reactive oxygen species and as a substrate for several peroxidases (1). The brain is particularly susceptible to oxidative insults and is, therefore, very dependent on its glutathione content, especially during development, when brain metabolism and growth are maximal. In addition, various pathologies affecting the nervous system involve oxidative stress, possibly associated with a diminution of glutathione levels. The rate-limiting enzyme for glutathione is the L- γ -glutamyl-cysteine synthetase, although glutamate levels, particularly in astrocytes, are equally important for the production of new glutathione (1,2).

Malnutrition is an important and very common insult to human development and compromises antioxidant defense in the body, particularly glutathione levels (3). There are several studies in animal models showing the biochemical changes in the brain caused by protein malnutrition involving specific neurotransmitters (4) and, more recently, we have shown changes in the neurotransmission mediated by glutamate, the main excitatory neurotransmitter (5).

Astrocytes are intimately related to glutamatergic transmission and antioxidant defense (6,7). These cells play an essential role during development and adulthood, including migration and synaptogenesis, release of neurotrophic factors, control of energetic metabolism, regulation of extracellular ionic composition and uptake/recycling of neurotransmitters.

Our previous results indicate important alterations in astrocyte markers (S100B protein and glial fibrillary acidic protein) induced by protein malnutrition in rats, as well as alterations in the oxidative status of these animals (8). Together, these alterations suggest that the brain content of glutathione and related metabolic pathways, predominantly played by astrocytes (particularly glutamate uptake and glutamine synthesis) may be altered by protein malnutrition and this, therefore, would contribute to a higher vulnerability of oxidative damage in malnourished animals (9).

In this study, we measured glutathione content, glutamine synthetase activity and glutamate uptake activity, as well as other parameters of oxidative stress, namely free radical content, lipid peroxidation, total antioxidant reactivity (TAR) and antioxidant enzyme activities, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase, in different brain regions (cerebral cortex, hippocampus and cerebellum) from rats submitted to pre and postnatal protein malnutrition.

Material and Methods

Chemicals

Thiobarbituric acid and Trolox were obtained from Merck, 2,2'-azobis (2-amidinopropane), dihydrochloride (ABAP) was obtained from Wako Chemicals USA, Inc., 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF), trichloroacetic acid (TCA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol), H₂O₂, glutathione reductase, all reagents used for glutathione assay and glutamic acid stock solution were purchased from Sigma Chemical Co. L – [2,3 – ³H] glutamic

acid ($[^3\text{H}]$ Glu) (specific activity 49Ci/mmol) was from Amersham International (Buckinghamshire, UK). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

Animals

Albino Wistar rats were maintained under standard conditions (12-h light/ 12-h dark, temperature 22 ± 2 °C); food and water were given *ad libitum*. The experimental protocol was developed according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Brazil.

Diets

The animals had free access to isocaloric diets (Table 1) containing 25% or 7% protein (casein), salts, and vitamins as recommended by the Association of Official Analytical Chemists (10) and previously described by our group (11).

Malnutrition Model

Prenatal and lactational malnutrition was induced by restricting the protein content of the mothers' diet to 7% (control group: 25% protein) during the entire gestation and lactational periods, resulting in a decrease in global amount of nutrients accessible to pups, whereas malnutrition for up to 21 and 60 days was induced by maintaining the same 7% protein diet. Both diets were isocaloric, and they were given *ad libitum*. The litter size was adjusted to eight pups per mother on the first postpartum day and they were maintained at 22°C on a 12 h light/12 h dark cycle until experimental age. For biochemical assays the animals were sacrificed on the 2nd (P2), 15th (P15) or 60th (P60) postnatal days by decapitation and specific brain regions (cerebral cortex, hippocampi and cerebellum) were dissected out.

Total Glutathione assay

Total glutathione content was determined by a slightly modified assay, as described previously (12) and first described by Tietze (13). Briefly, the tissue was homogenized in phosphate buffered saline (PBS) (0.01 M, pH 7.6), 6.3 mmol edetic acid (pH 7.5) and Triton-X (0.05%). After homogenization, 5 μ l was taken for protein assay, and 1% sulfosalicylic acid (SSA) was then added. The mixture was then allowed to precipitate for 2h at 4°C. After centrifugation, at 10 000 g for 15 min, protein free supernatants were obtained. For glutathione determination, 25 μ l of supernatant was assayed in a total volume of 200 μ l phosphate buffer containing 462.6 μ M 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 0.5 U/ml glutathione reductase, and 0.3 mM NADPH. The reduction of DTNB was followed spectrophotometrically at 412 nm (25°C) and related to a calibration curve.

Free radical levels

An aliquot of the sample was incubated with DCFH-DA (100 μ mol/L) at 37°C for 30 min. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 488 nm and 525 nm, respectively, using a fluorescence spectrophotometer (Hitachi F-2000). The formation of reactive oxygen species was quantified using a DCF standard curve and results were expressed as pmol of DCF formed/mg protein (14)

Lipid peroxidation assay

Sample aliquots were incubated with 46 mmol/L trichloroacetic acid (TCA) and 0.60 mol/L thiobarbituric acid (TBA). The mixture was heated in a boiling water bath for 30 min, an equal volume of n-butanol added and the final mixture

centrifuged; the organic phase was collected for fluorescence measurements, at excitation and emission wavelengths of 515 and 553 nm, respectively (15). We used 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) was used as standard. Results are reported as pmol MDA /mg protein.

Total Antioxidant Reactivity (TAR) Assay

The TAR assay is based on luminol-enhanced chemiluminescence (CL), induced by an azo initiator (16,17). The reaction mixture contained 2 mmol/L ABAP and 6 mmol/L luminol in glycine buffer. TAR values were determined by assessing the initial decrease of luminescence, calculated as the ratio “I₀/I”, where “I₀” is the CL in the absence of additives, and “I” is the CL after the addition of 20 nmol/L Trolox or samples (1 µl). TAR values were expressed as equivalents of Trolox concentration per mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was determined using a RANSOD kit (Randox labs, USA). This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate O₂⁻, which reacts with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride to form a red formazan dye that is assayed spectrophotometrically at 505 nm at 37°C. The inhibition of production of the chromogen is proportional to the activity of SOD present in the sample.

Catalase (CAT) activity

The homogenate was incubated with ethanol (46 mmol/L) and Triton X-100 (10%). The activity was assayed at 25°C by determining the rate of degradation of H₂O₂ at 240 nm in 10mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.0). The extinction coefficient of 43.6 mmol/L⁻¹ cm⁻¹ was used for calculation. One unit is

defined as one pmol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity is reported as units per mg protein (18).

Glutathione peroxidase (GPx) activity

The reaction was carried out at 25°C in 600 µl of a solution containing 100 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 7.7, 1 mmol/L EDTA, 0.4 mmol/L sodium azide, 2 mmol/L GSH, 0.1 mmol/L NADPH and 0.62 U GSH reductase. The activity of selenium-dependent GPx was measured by using tert-butylhydroperoxide as a substrate at 340 nm. The contribution of spontaneous NADPH oxidation was always subtracted from the overall reaction rate. GPx activity was expressed as nmol NADPH oxidized per minute per mg protein (19).

Glutamine Synthetase Activity Assay

The enzymatic assay was performed according to Petito and co-workers (20), with some modifications. Briefly, homogenate (0.1 mL) was added to 0.1 ml of reaction mixture containing: 10 mmol/L MgCl₂; 50 L-glutamate; 100 mmol/L imidazole-HCl buffer (pH 7.4); 10 mmol/L 2-mercaptoethanol; 50 mmol/L hydroxylamine-HCl; 10 mmol/L ATP and incubated for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 0.4 mL of a solution containing: 370 mmol/L ferric chloride; 670 mmol/L HCl; 200 mmol/L trichloroacetic acid. After centrifugation, the supernatant was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities of γ-glutamylhydroxamate (from Sigma) treated with ferric chloride reagent.

[³H]Glutamate uptake in slices

Animals were decapitated and brains were immediately removed and submerged in Hank's balanced salt solution (HBSS), pH 7.2. Cerebral cortices

and hippocampi were dissected in Petry dishes filled with HBSS (room temperature) and coronal slices (0.4 mm) were obtained from the parietal area using a Mc Illwain tissue chopper. The glutamate uptake assay, performed according to our previous reports (11), was assessed by adding 100 $\mu\text{mol/L}$ [^3H]Glut (21) in 0.3 mL HBSS, at 37 °C. Incubation was stopped after 7 min, for cortex, and 5 min, for hippocampus, by two ice-cold washes with 1 mL HBSS, immediately followed by addition of 0.5 mol/L NaOH, which was kept overnight. Sodium-independent uptake was determined by using N-methyl-d-glucamine instead of sodium chloride, which was subtracted from the total uptake to obtain the sodium-dependent uptake. Intracellular [^3H]Glut content was determined by scintillation counting. Experiments were performed in triplicate.

Protein Assay

The total protein concentration was determined using the method described by Lowry and co-workers (22), using bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Data were analyzed statistically by Student's *t* test between malnourished and control at each age, with the level of significance set at $p < 0.05$. ANOVA was used to characterize the ontogenetic profile of control and malnourished rats.

Results

The severity of the protein malnutrition model was confirmed by the body and brain weight decrease on the 2nd, 15th and 60th postnatal days (data not shown).

An ontogenetic variation in glutathione content in three brain regions is shown in Fig 1, where it is possible to observe a significant increment between 2 and 15 postnatal days. On the 60th postnatal day, the glutathione content, in cerebral cortex and cerebellum, falls to 50% but is still higher than on the 2nd postnatal day. In hippocampus, no difference was found between 15 and 60-day old rats. A significant decrease in glutathione was observed on the 2nd postnatal day in all analyzed brain regions. This decrease also was observed on the 15th postnatal day in cerebral cortex and cerebellum, but not in hippocampus. On the 60th postnatal day, no differences were observed between controls and malnourished rats.

In order to characterize the alteration on 2nd postnatal day, we investigated other oxidative parameters in the cerebral cortex and hippocampus. In agreement with glutathione decrease, we found reduced total antioxidant reactivity (TAR). Moreover, we observed a reduced content of free radicals, measured by DCF assay in the cerebral cortex and hippocampus of 2-day-old malnourished rats (Fig 2). No lipid peroxidation was observed by TBARS measurement. Aromatic residue contents of tyrosine and tryptophan, very susceptible to oxidative damage, were also not altered in malnourished rats (data not shown). In addition, we found a reduced activity of glutathione peroxidase in cerebral cortex and hippocampus (Fig 3). The activity of other

antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) was not altered in malnourished rats on the 2nd postnatal day.

An ontogenetic increment in glutamine synthetase activity was observed between 2 and 15 postnatal days, in all analyzed brain regions, independent of nutritional status (Fig 4). A developmental decrease was observed in cerebral cortex and hippocampus on the 60th postnatal day. Interestingly, malnourished rats exhibited an increased activity of glutamine synthetase (about 25%), in all brain regions, only on the 2nd postnatal day. No changes between control and malnourished animals were observed later.

A higher glutamate uptake activity was found in hippocampal slices (ranging from 0.8 to 1.5 nmol/mg prot/min) than in cerebral cortical slices (ranging from 0.5 to 0.9 nmol/mg prot/min) in all analyzed ages, independent of nutrition status. Glutamate uptake was expressed as a percentage of controls at the same age (Fig 5). We found a significant decrease in glutamate uptake (about 15%) in hippocampus and cerebral cortex in malnourished animals on the 2nd postnatal day. This difference persisted in the hippocampus until the 15th postnatal day. However, no alterations were observed on the 60th postnatal day.

Discussion

Glutathione is the most abundant low-molecular-weight thiol involved in antioxidant defense in animal cells. Virtually all cells are able to synthesize glutathione from glutamate, cysteine and glycine. Hepatocytes are the major producers and exporters of glutathione (1). In the central nervous system, astrocytes play a central role in the metabolism of glutathione (7). Glutathione deficiency contributes to oxidative stress of many brain disorders including

seizure and stroke, as well as, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Protein malnutrition, therefore, could affect astrocyte activity and increase the brain vulnerability to oxidative stress.

Looking at the ontogeny of brain glutathione content in control rats, an intense increase may be observed next to the synaptogenesis peak, which occurs in the second postnatal week (23). Similarly, Nanda and co-workers (24) described an increment in the glutathione in cerebral cortex and cerebellum at the beginning of the second postnatal week. Although malnourished rats had a similar ontogenetic profile of glutathione content, we found a decrease in glutathione in the first two weeks in all analyzed brain regions. In hippocampus, this decrease was observed only in the first week. This glutathione deficit was accompanied by a reduced TAR and glutathione peroxidase activity, suggesting a lower antioxidant defense in malnourished animals. Moreover, glutathione plays other intracellular roles, including formation of S-nitroso-L-glutathione, cytokine production, cell proliferation and apoptosis (1).

It is important to emphasize that this glutathione deficit it is likely to be due to a prenatal nutritional insult. Moreover, a full recovery in glutathione content is observed in these animals, in spite of the persistent nutritional postnatal insult. The mechanism involved in the glutathione deficit is unclear at present, but it could involve a down-regulation of the GCS expression (γ -glutamyl-cysteine synthetase) by protein deficiency or a decrease in GCS activity by NO donors (25).

Our data indicate that protein malnutrition induced a deficit in antioxidant defense, but did not cause *per se* an increase of reactive oxygen species

(ROS). On the contrary, we found a decrease on free radical levels in all brain structures. Interestingly, it has been reported that protein malnutrition is accompanied by a decrease in brain and liver mitochondrial metabolism in brain and liver (26,27), which could result in lower ROS production.

Glutamatergic neurotransmission and glutamate metabolism also are subjected to dramatic modifications during synaptogenesis, based on changes in glutamate receptors (28) and glutamate transporters (29,30). In addition, we found an intense increase in glutamine synthetase activity on the 15th postnatal day in control rats. A higher glutamine synthetase activity was found in malnourished rats on the 2nd postnatal day, but was not different on the 15th and 60th postnatal days. Again, protein malnutrition appears to cause more damage/alteration during the prenatal phase.

Glutamine is the main source of nitrogen for biosynthesis of glutamate and has a strong relationship with the intracellular redox status (31). Glutamine, as a substrate, may promote amino acid, nucleotide and protein synthesis, as well as glutathione via glutamate delivery. For this, a glial phosphate-activated glutaminase is important (32); moreover, glutamine is an amino donor for glucosamine synthesis from fructose-6-phosphate. Both glutamine and glucosamine are able to inhibit the pentose cycle and, therefore, NADPH production in endothelial cells (1). The elevated glutamine synthetase activity could be a compensatory mechanism for glutamate delivery (and, thus, glutathione), since glutamate uptake is reduced in malnourished animals. On the other hand, the resulting glutamine (and glucosamine) may inhibit NADPH production and contribute to the decrease in glutathione levels. However, we

are not aware of any published report describing any effect of glutamine (or glucosamine) on NADPH production in astrocytes.

It has been proposed that brain glutamine synthetase works near to its maximal capacity under physiological conditions (33). Moreover, it accepted that, as we have shown herein, glutamine synthetase is developmentally regulated and that an increase in its activity is associated with astrocyte differentiation rather than proliferation (34). Thus, the increase observed in malnourished rats is possibly due to a greater amount of the enzyme. In agreement with this, it is known that other glial markers of differentiation (glial fibrillary acidic protein and S100B protein) are also increased on the 2nd postnatal day in malnourished rats (unpublished data).

Another relevant finding is the reduced glutamate uptake in the first postnatal week in the protein malnutrition group. The lower glutamate entry, in turn, could affect cysteine uptake (which is dependent on glutamate efflux) (35) and, therefore, accentuate the decrease in glutathione levels. It should be pointed out that oxidative stress impairs glutamate uptake and γ -glutamyltranspeptidase activity (two alternatives to cysteine transport) (36). However, we did not find evidence of elevated free radicals or oxidative damage in samples from malnourished rats, regardless of the low levels of antioxidant defense (glutathione and TAR levels) in these animals.

In summary, all rat brain alterations observed in the first postnatal week that were induced by protein malnutrition, the decrease in glutathione content, decrease in glutamate uptake and the increase in glutamine synthetase, indicate specific changes in astrocyte metabolism and, consequently, a higher vulnerability to excitotoxic/oxidative damage. The lower antioxidant defense

appears to be the main alteration that causes the oxidative imbalance, rather than an increase in reactive oxygen species. Moreover, a full recovery of the altered parameters may be observed during adulthood, in spite of the persistent protein malnutrition insult. Other and lasting alterations cannot be rule out, however (8).

References

1. Wu G, Haynes TE, Li H, Yan W, Meininger CJ. Glutamine metabolism to glucosamine is necessary for glutamine inhibition of endothelial nitric oxide synthesis. *Biochem J.* 2001;353:245-52.
2. Mates JM, Peres-Gomes C, Nunez de Castro I, Asenio M, Marquez J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:439-58.
3. Li J, Wang H, Stoner GD, Bray TM. Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein-malnourished mice (1). *J Nutr Biochem.* 2002;13:625-33.
4. Steiger JL, Alexander MJ, Galler JR, Farb DH, Russek SJ. Effects of prenatal malnutrition on GABAA receptor alpha1, alpha3 and beta2 mRNA levels. *Neuroreport.* 2003;14:1731-5.
5. Rotta LN, Schmidt AP, Mello e Souza T, Nogueira CW, Souza KB, Izquierdo IA, Perry ML, Souza DO. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem Res.* 2003;28:1181-6.
6. Araque A, Perea G. Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia.* 2004;47:241-8.
7. Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2004;72:111-27.
8. Feoli AM, Siquiera IR, Almeida L, Tramontina AC, Vanzella C, Sbaraini et al. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition* In press 2006.

9. Bobyn PJ, Corbett D, Saucier DM, Noyan-Ashraf MH, Juurlink BH, Paterson PG. Protein-energy malnutrition impairs functional outcome in global ischemia. *Exp Neurol.* 2005;196:308-15.
10. Horwitz W. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists AOAC, Washington, DC, USA, 1980.
11. Schweigert I, de Oliveira DL, Scheibel F, da Costa F, Wofchuk ST, Souza D, Perry MLS. Gestational and postnatal malnutrition affects sensitivity of young rats to picrotoxin and quinolinic acid and uptake of GABA by cortical and hippocampal slices. *Brain Res Dev Brain Res.* 2005;154:177-85.
12. Allen S, Shea JM, Felmet T, Gadra J, Dehn P. A kinetic microassay for glutathione in cells plated on 96-well microtiter plates. *Methods in Cell Sci.* 2001;22: 305-12.
13. Tietze F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amount of total oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969, 27:502-22.
14. Sriram K, Pai KS, Boyd MR, Ravindranath V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res.* 1997;21:44-52.
15. Bromont C, Marie C, Bralet J. Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke.* 1989;20:918-24.
16. Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-

- enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med.* 1995;18:153-8.
17. Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys.* 2001;388:261-6.
 18. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
 19. Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1981;77:325-33.
 20. Petito, CK, Chung, MC, Verkhovsky, LM, Cooper, AJL. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 1992;569:275-80.
 21. Swanson, R.A., Farrell, K., Simon, R.P. Acidosis causes failure of astrocytes glutamate uptake during hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:417-24.
 22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
 23. Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002;26:471-83.
 24. Nanda D, Tolputt J, Collard KJ. Changes in brain glutathione levels during postnatal development in the rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996;94:238-41.
 25. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul.* 2000;36:95-116.

26. Olorunsogo OO. Changes in brain mitochondrial bioenergetics in protein-deficient rats. *Br J Exp Pathol.* 1989;70:607-19.
27. Olorunsogo OO. Defective mitochondrial cation transport during dietary protein deficiency in rats. *Afr J Med Med Sci.* 1992;21:23-31.
28. Lujan R, Shigemoto R, Lopez-Bendito G. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience.* 2005;130:567-80.
29. Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci.* 1997;17:8363-75.
30. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001;65:1-105.
31. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I, Asenjo M, Marquez J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:439-58.
32. Olalla L, Aledo JC, Bannenberg G, Marquez J. The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Lett.* 2001;488:116-22.
33. Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol.* 2002;67:259-79.
34. Patel AJ, Hunt A, Gordon RD, Balazs R. The activities in different neural cell types of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation glutamate. *Brain Res.* 1982;256:3-11.
35. Mc Bean GJ, Flynn J. Molecular mechanisms of cystine transport. *Biochem Soc Trans.* 2001;29:717-22.

36. Trotti, D, Rizzini, BL, Rossi, D, Haugeto, O, Racagni, G, Danbolt, NC, Volterra, A, Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur J Neurosci.* 1997;9:1236-43.

Figure legends

Figure 1. *Glutathione content in the brain tissue of rats exposed to protein malnutrition (PMN).* Rats were exposed to a 7% protein diet during pre and postnatal life. Three brain regions were dissected out (cerebral cortex, hippocampus and cerebellum) and glutathione content was measured on the 2nd, 15th and 60th postnatal days. Values are means \pm standard errors of 7-8 rats in each group * Significantly different from respective control ($p < 0.05$).

Figure 2. Effect of protein malnutrition on total antioxidant reactivity, free radical content and lipid peroxidation in brain tissue. Cerebral cortical (Cx) or hippocampal (Hc) slices from 2 day-old rats exposed to protein malnutrition (PMN) were used to measure total antioxidant reactivity (TAR, in A panel), free radical content measured by DCF levels (in B panel) and lipid peroxidation measured by TBARS levels (in C panel). Values are means \pm standard errors of 6-8 rats in each group * Significantly different from respective control ($p < 0.05$).

Figure 3. Effect of protein malnutrition on brain antioxidant enzymes. Cerebral cortical (Cx) or hippocampal (Hc) slices from 2 day-old rats exposed to protein malnutrition (PMN) were used to measure the enzyme activities of glutathione peroxidase (GPx, in A panel), superoxide dismutase (SOD, in B panel) and catalase (in C panel). Values are means \pm standard errors of 6-8 rats in each group * Significantly different from respective control ($p < 0.05$).

Figure 4. *Glutamine Synthetase activity in the brain tissue of rats exposed to protein malnutrition (PMN).* Rats were exposed to a 7% protein diet during pre and postnatal life. Three brain regions were dissected out (cerebral cortex, hippocampus and cerebellum) and glutamine synthetase activity content was measured on the 2nd, 15th and 60th postnatal days. Values are means \pm standard errors of 6-8 rats in each group * Significantly different from respective control ($p < 0.05$).

Figure 5. *Glutamate uptake in the brain tissue of rats exposed to protein malnutrition* Rats were exposed to a 7% protein diet during pre and postnatal life. Glutamate uptake was measured in cerebral cortical and hippocampal slices from malnourished rats on the 2nd, 15th and 60th postnatal days and compared to control rats assumed to be 100% at the same age. Values are means \pm standard errors of 7-8 rats in each group * Significantly different from respective control ($p < 0.05$).

Table 1. Nutritional Composition of the diets*

	25% protein diet (g/kg)	7% protein diet (g/kg)
Casein (87% protein)**	287	80.50
Fat (soybean oil)	150	150
Carbohydrate (corn starch)	501.5	708
Salt mix [†]	40	40
Vitamin mix [‡]	10	10
Non-nutritive fiber	10	10

* Salt and vitamin compositions are according to (10).

Energy for both diets: 4.3 kcal/g diet in both diets.

** Casein, purity 87% (from Farmaquímica, Porto Alegre, Brazil) supplemented with 0.15% L-methionine (from Merck, Rio de Janeiro, Brazil).

[†] Mineral mixture (from Roche, São Paulo, Brazil) mg/100 g of ration: NaCl, 557; KCl, 3.2; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄·7H₂O, 108; MnSO₄·H₂O, 16; ZnSO₄·7H₂O, 2.2; CuSO₄·5H₂O, 1.9; CaCl₂·6H₂O, 0.09.

[‡] Vitamin mixture (from Roche, São Paulo, Brazil), mg/100g of ration: vitamin A, 4; vitamin D, 0.5; vitamin E, 10; menadione, 0.5; choline, 200; PABA, 10; inositol, 10; niacin, 4; pantothenic acid, 4; riboflavin, 0.8; thiamin, 0.5; pyridoxine, 0.5; folic acid, 0.2; biotin, 0.04; vitamin B12, 0.003.

Figure 1

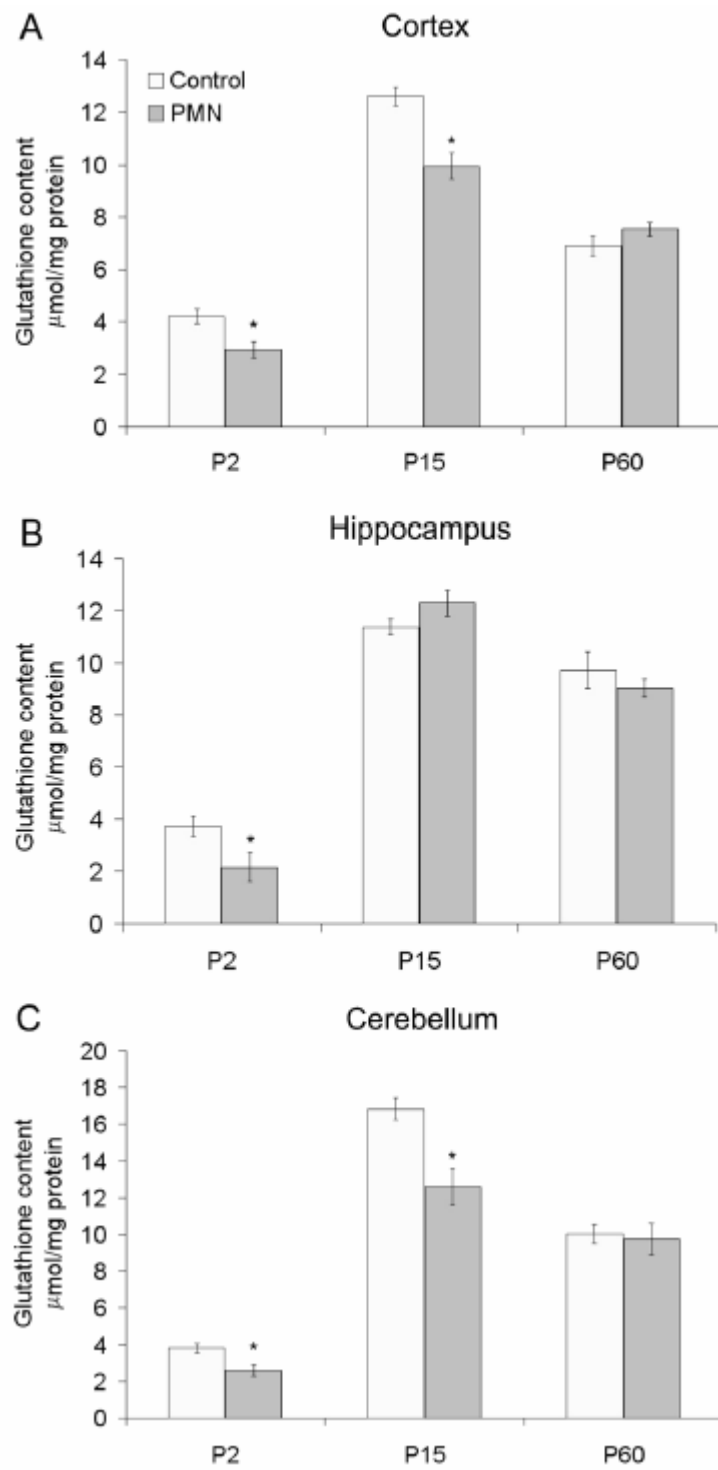


Figure 2

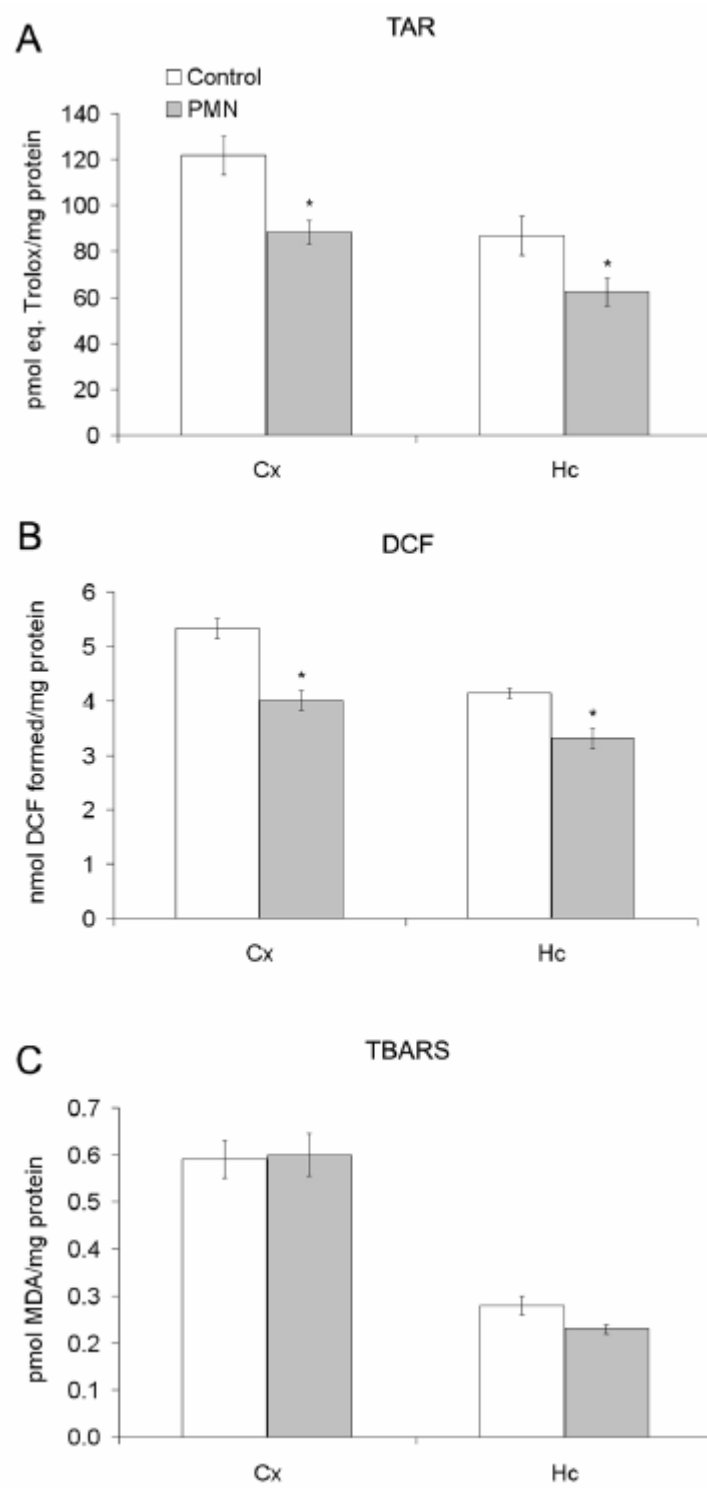


Figure 3

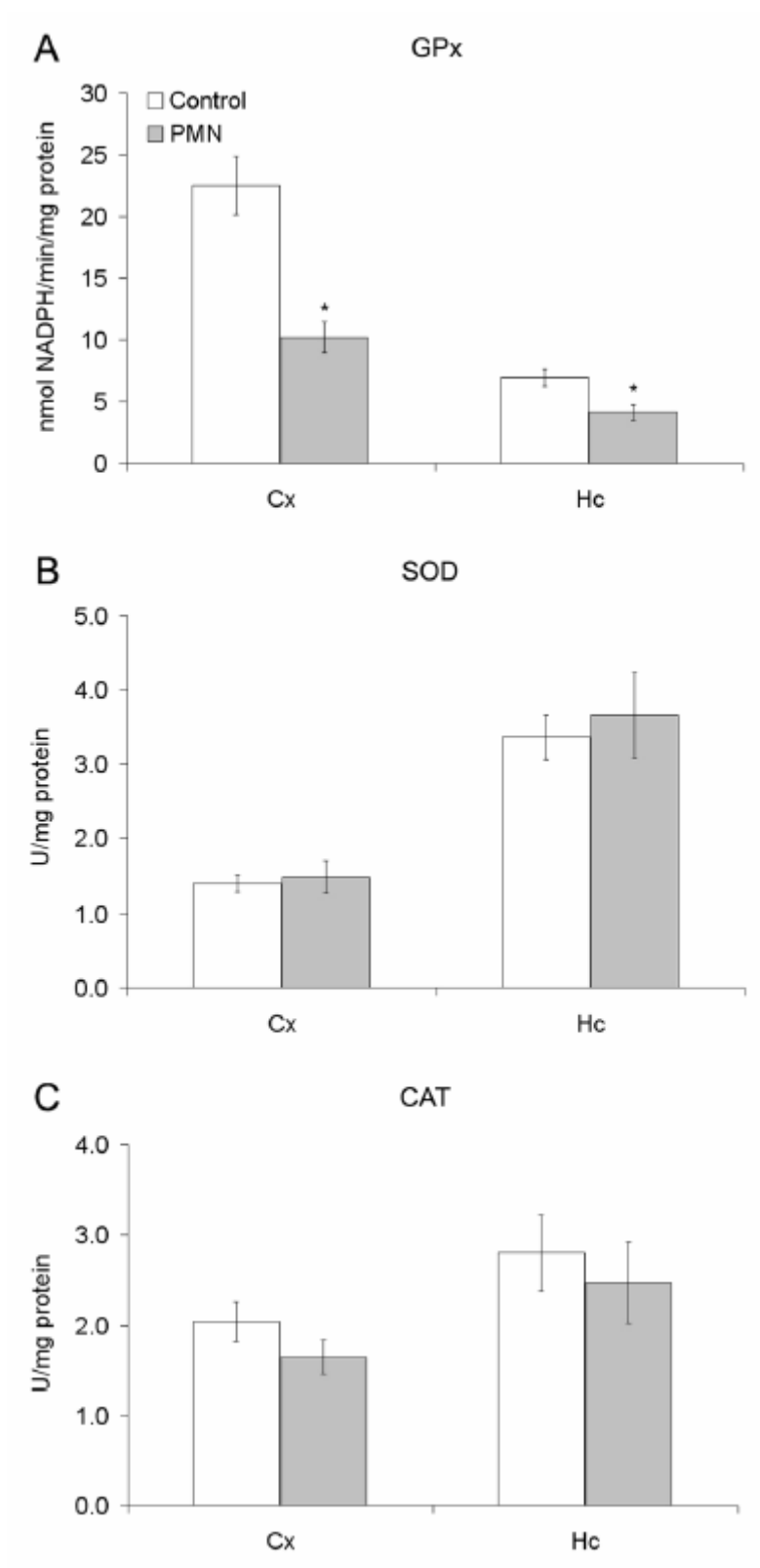


Figure 4

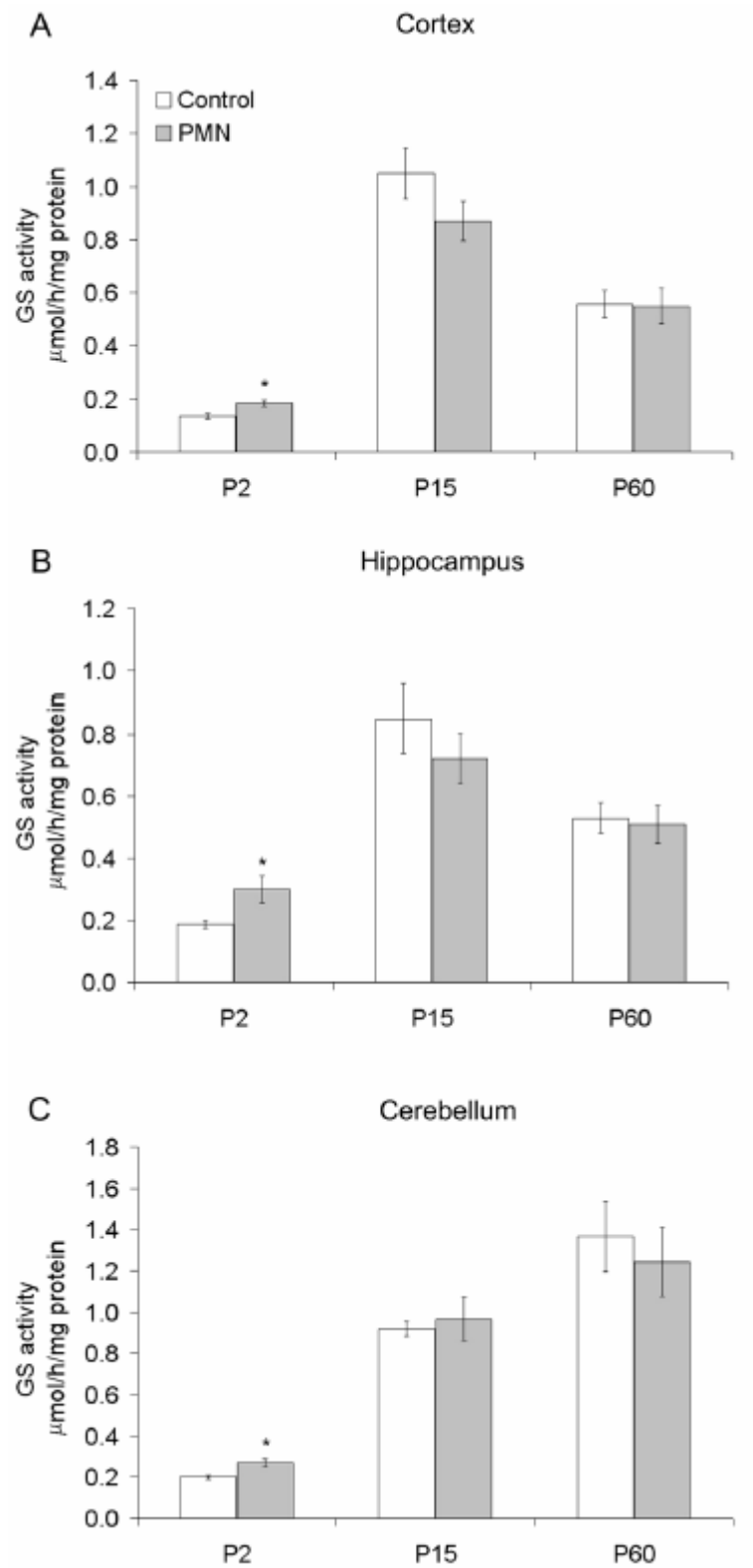
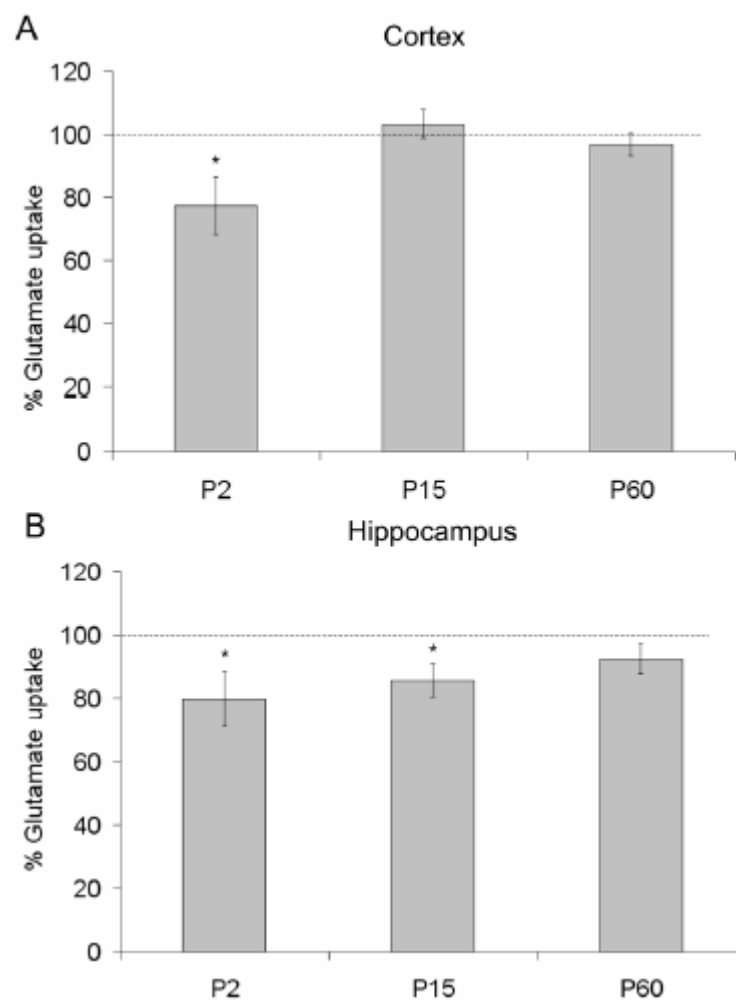


Figure 5



Artigo 3

Título: Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain.

Autores: Ana M. Feoli M.Sc., Ionara R. Siqueira Ph.D., Lúcia Almeida M.Sc., Ana C. Tramontina, Cláudia Vanzella, Sabrina Sbaraini, Ingrid D. Schweigert. M.Sc., Carlos A. Netto Ph.D., Marcos L. S. Perry Ph.D., Carlos A. Gonçalves Ph.D.

Artigo publicado no periódico Nutrition, 2006: 2, 160-165.

Basic nutritional investigation

Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain

Ana M. Feoli, M.Sc.^{a,b}, Ionara R. Siqueira, Ph.D.^{c,*}, Lúcia Almeida, M.Sc.^a,
Ana C. Tramontina^a, Cláudia Vanzella^c, Sabrina Sbaraini^c, Ingrid D. Schweigert, M.Sc.^{a,d},
Carlos A. Netto, Ph.D.^a, Marcos L. S. Perry, Ph.D.^a, and Carlos A. Gonçalves, Ph.D.^a

^a Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Departamento de Ciências da Saúde, Unijuí/Ijuí, Rio Grande do Sul, Brazil

Manuscript received February 25, 2005; accepted June 4, 2005.

Abstract

Objectives: This study evaluated the effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain areas.

Methods: We investigated various parameters of oxidative status, free radical content (dichlorofluorescein formation), indexes of damage to lipid (thiobarbituric acid-reactive substances assay), and protein damage (tryptophan and tyrosine content) in addition to total antioxidant reactivity levels and antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in different cerebral regions (cortex, hippocampus, and cerebellum) from rats subjected to prenatal and postnatal protein malnutrition (control 25% casein and protein malnutrition 7% casein).

Results: Protein malnutrition altered various parameters of oxidative stress, especially damage to macromolecules. Free radical content was unchanged by protein malnutrition. There was an increase in levels of thiobarbituric acid-reactive substances, the index of lipid peroxidation, in the cerebellum and cerebral cortex ($P < 0.05$) from protein-malnourished rats. Moreover, significant decreases in tryptophan and tyrosine in all tested brain structures ($P < 0.05$) were observed. Catalase activity was significantly decreased in the cerebellum ($P < 0.05$). In addition, a significant decrease in total antioxidant reactivity levels ($P < 0.05$) was observed in the cerebral cortex from protein-malnourished rats.

Conclusions: The present data indicated that protein malnutrition increased oxidative damage to lipids and proteins from the studied brain areas. These results may be an indication of an important mechanism for changes in brain development that are caused by protein malnutrition. © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords:

Protein malnutrition; Brain; Free radical; Oxidative damage; Antioxidant capacity

Introduction

Malnutrition corresponds to worldwide, severe health and socioeconomic problems. Nutritional inadequacy, including maternal malnutrition, is a major non-genetic factor that leads to disturbances in development of the brain [1].

This study was supported by Brazilian funds from CNPq, FINEP, CAPES, and FAPERGS.

* Corresponding author. Tel.: +55-51-3714-7001; fax: +55-51-3316 5535.

E-mail address: ionara@ufrgs.br (I.R. Siqueira).

Some studies have demonstrated that malnourished children have more learning and behavioral problems than do well-nourished children [2].

Many investigators have found biochemical alterations in nervous systems in experimental models of malnutrition, especially those related to neurotransmitter systems [3,4]. Histologic changes also have been demonstrated by decreased neuronal and glial cell density in the cerebral cortex and cerebellum [5] and decreased dendritic spines in the cingulate cortex and hippocampus of malnourished rats [6,7].

It has been suggested that oxidative damage to macro-

molecules occurs in clinical manifestations of kwashiorkor, a severe form of protein-energy malnutrition that is clinically characterized by edema [8,9]. As first proposed by Golden and Ramdath [10], oxidative stress, an imbalance between free radical generation and tissue antioxidant capacity, is involved in the pathophysiology of kwashiorkor.

Free radicals such as superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals and alkoxy and peroxy radicals are continually generated during oxidative metabolism. An overload of free radicals may oxidize critical biological molecules, producing membranous lipid peroxidation, specific protein damage, and DNA strand breaks [11]. The lipid oxidative damage, lipid peroxidation, is accompanied by generation of aldehyde products such as malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal; these are chemically reactive and may covalently modify cellular macromolecules, especially proteins. A highly reactive free radical attacks amino acid residue proteins and an oxidative modification may lead to structural alteration and generally to functional inactivation of enzymes. Oxidation of amino acid side chains greatly depends on their structure. Oxidative modifications occur at specific amino acid residues, such as arginine, lysine, proline, histidine, tryptophan, methionine, tyrosine, and phenylalanine residues [12].

The antioxidant defense system includes enzymes such as superoxide dismutase (SOD), which converts superoxide radicals into H_2O_2 , catalase (CAT), which has been shown to be responsible for detoxification of H_2O_2 , and glutathione peroxidase (GPx), which breaks down peroxides, notably those derived from the oxidation of membrane phospholipids. Moreover, there are also non-enzymatic antioxidants (carotenoids, vitamin E, and glutathione) with important roles in defense mechanisms [11]. Cellular damage occurs when there is oxidative stress, namely an imbalance between free radical generation and scavenging systems.

The brain may be particularly vulnerable to free radicals due to its high rate of oxidative metabolic activity, high content of polyunsaturated fatty acids, regions rich in iron concentration, and moderate levels of antioxidant [13].

We hypothesized that an increase in free radical content and/or its interaction with macromolecules, especially proteins, could be a potential mechanism for changes in brain development that are related to protein malnutrition. To verify a relation between brain oxidative damage and protein malnutrition, we investigated various parameters of oxidative status, namely free radical content and indexes of damage to macromolecules, i.e., lipid and protein damage, in addition to total antioxidant reactivity (TAR) levels and antioxidant enzyme activities of SOD, GPx, and CAT in different cerebral regions (cortex, hippocampus, and cerebellum) from rats subjected to prenatal and postnatal protein malnutrition.

Materials and methods

Chemicals

Thiobarbituric acid and Trolox were obtained from Merck (Rio de Janeiro, Brazil); 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) was obtained from Wako Chemicals (Richmond, VA, USA); and 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate, 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF), trichloroacetic acid, phenyl methyl sulfonyl fluoride, 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol), and H_2O_2 stock solution were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Animals

Albino Wistar rats were maintained under standard conditions (12-h light/12-h dark, temperature $22 \pm 2^\circ C$); food and water were given ad libitum. The experimental protocol was developed according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Brazil.

Diets

Animals had free access to isocaloric diets (Table 1) that contained 25% or 7% protein (casein), salts, and vitamins as recommended by the Association of Official Analytical Chemists (Horwitz W. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of

Table 1
Nutritional composition of the diets*

	25% Protein diet	7% Protein diet
Casein (87% protein) [†] (g/kg diet)	287	80.50
Fat (soybean oil) (g/kg diet)	150	150
Carbohydrate (corn starch) (g/kg diet)	501.5	708
Salt mix [‡] (g/kg diet)	40	40
Vitamin mix [§] (g/kg diet)	10	10
Non-nutritive fiber (g/kg diet)	10	10

* Salt and vitamin compositions are according to Horwitz (Horwitz W. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 1980). Energy for both diets was 4.3 kcal/g of diet.

[†] Casein, purity 87% (from Farmaquímica, Porto Alegre, Brazil), supplemented with 0.15% L-methionine (from Merck, Rio de Janeiro, Brazil).

[‡] Mineral mixture (from Roche, São Paulo, Brazil; mg/100 g of ration): NaCl, 557; KCl, 3.2; KH_2PO_4 , 1556; $MgSO_4$, 229; $CaCO_3$, 1526; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 108; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 16; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.2; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1.9; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.09.

[§] Vitamin mixture (from Roche, São Paulo, Brazil; mg/100 g of ration): vitamin A, 4; vitamin D, 0.5; vitamin E, 10; menadione, 0.5; choline, 200; *p*-aminobenzoic acid (PABA), 10; inositol, 10; niacin, 4; pantothenic acid, 4; riboflavin, 0.8; thiamin, 0.5; pyridoxine, 0.5; folic acid, 0.2; biotin, 0.04; vitamin B12, 0.003.

Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 1980) and previously described by our group [3].

Malnutrition model

Prenatal and lactational malnutrition was induced by restricting to 7% the protein content of the mothers' diet (control group, 25% protein) during the entire gestation and lactational periods, whereas malnutrition up to 60 d was induced by maintaining the same 7% protein diet. Both diets were isocaloric and were given ad libitum. Litter size was adjusted to eight pups per mother on the first postpartum day and they were maintained at 22°C on a 12-h light/12-h dark cycle until they were of experimental age.

Tissue preparation

Rats were killed by decapitation, and hippocampi, cerebral cortices, and cerebella were dissected out and instantaneously placed at -70°C until biochemical measurements, when they were homogenized in 10 vol of ice-cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 140 mM of KCl, 1 mM of ethylenediaminetetraacetic acid, and 1 mM of phenyl methyl sulfonyl fluoride. The homogenate was centrifuged at 960g for 10 min and the supernatant was used. All steps were carried out at 4°C.

Free radical levels

An aliquot of the sample was incubated with 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (100 µM) at 37°C for 30 min. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 488 and 525 nm, respectively, using a fluorescence spectrophotometer (Hitachi F-2000; Hitachi, Tokyo, Japan). The formation of reactive oxygen species was quantified by using a DCF standard curve and results were expressed as picomoles of DCF formed milligram of protein [14].

Lipid peroxidation assay

Sample aliquots were incubated with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid. The mixture was heated on a boiling water bath for 30 min, an equal volume of *n*-butanol was added, and the final mixture was centrifuged; the organic phase was collected for fluorescence measurements at excitation and emission wavelengths of 515 and 553 nm, respectively [15]. We used 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the standard. Results are reported as picomoles of malondialdehyde per milligram of protein.

Degradation of protein tryptophan residues

Sodium dodecylsulfate was added to sample aliquots (final concentration 0.1%). The tryptophan content within

solubilized proteins was determined fluorometrically at excitation and emission wavelengths of 280 and 345 nm, respectively [16].

Degradation of protein tyrosine residues

Sodium dodecylsulfate was added to sample aliquots (final concentration 0.1%). The tyrosine content within solubilized proteins was determined fluorometrically at excitation and emission wavelengths of 277 and 320 nm, respectively [17].

TAR assay

The TAR assay is based on luminol-enhanced chemiluminescence induced by an azo initiator [18,19]. The reaction mixture contained 2 mM of ABAP and 6 mM of luminol in glycine buffer. TAR values were determined by assessing the initial decrease of luminescence, which was calculated as the ratio of chemiluminescence in the absence of additives to the chemiluminescence after the addition of 20 nM of Trolox or samples (1 µL). TAR values were expressed as equivalents of Trolox concentration per milligram of protein.

SOD activity

Superoxide dismutase activity was determined with a RAN-SOD kit (Randox Laboratories, San Diego, CA, USA). This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radical, which reacts with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride to form a red formazan dye that is assayed spectrophotometrically at 505 nm at 37°C. Inhibition of production of the chromogen is proportional to the activity of SOD present in the sample.

CAT activity

The homogenate was incubated with ethanol (10%) and Triton (10%). Activity was assayed at 25°C by determining the rate of degradation of H₂O₂ at 240 nm in 10 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0). The extinction coefficient of 43.6 mM/cm was used for calculation. One unit is defined as 1 pmol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity is reported as units per milligram of protein [20].

GPx activity

The reaction was carried out at 25°C in 600 µL of solution containing 100 mM of potassium phosphate buffer, pH 7.7, 1 mM of ethylenediaminetetraacetic acid, 0.4 mM of sodium azide, 2 mM of glutathione, 0.1 mM of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, and 0.62 U of glutathione reductase. Activity of selenium-dependent GPx was measured taking *tert*-butyl-hydroperoxide as the sub-

strate at 340 nm. The contribution of spontaneous nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidation was always subtracted from the overall reaction rate. GPx activity was expressed as nanomoles of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized per minute per milligram of protein [21].

Protein assay

Total protein concentration was determined according to the method described by Lowry [22] with bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically by Student's *t* test, with the level of statistical significance set at $P < 0.05$. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean.

Results

Prenatal and postnatal protein malnutrition decreased body and brain weights by about 65% and 40%, respectively (data not shown).

No differences on DCF levels were found in any brain region (Fig. 1A). In contrast, protein malnutrition altered various parameters of oxidative stress, specifically damaged macromolecules. There was an increase in levels of thio-

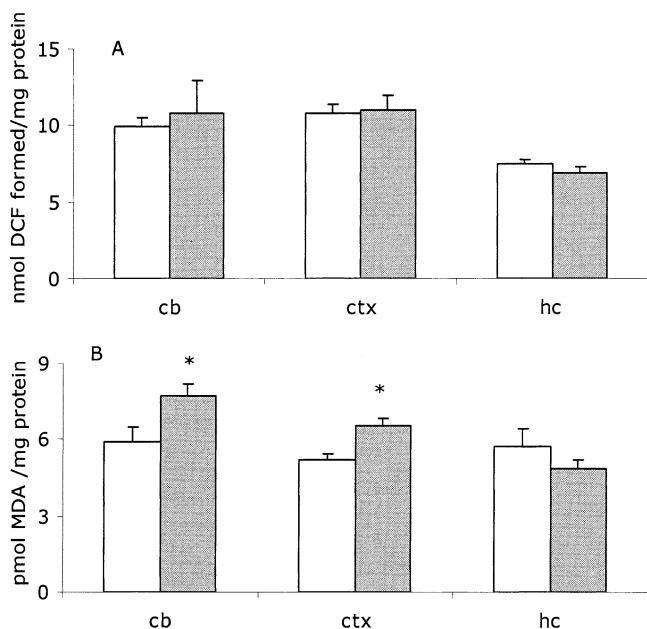


Fig. 1. Effects of protein malnutrition (gray bars) versus control (white bars) on free radical content (A) and lipid peroxidation (B) in studied brain areas. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean of seven to eight animals per group. Student's *t* test, * $P < 0.05$. cb, cerebellum; ctx, cortex; DCF, 2'-7'-dichlorofluorescein; hc, hippocampus; MDA, malondialdehyde.

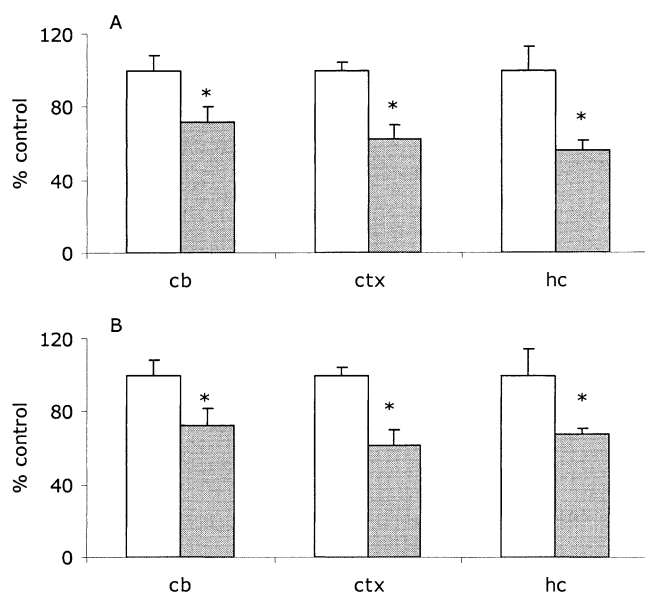


Fig. 2. Contents of tryptophan (A) and tyrosine (B) in studied brain structures from control (white bars) and protein malnutrition (gray bars). Data expressed as mean \pm standard error of the mean of seven to eight animals per group. Values from control animals were considered as being 100% in each experiment (Student's *t* test, * $P < 0.05$). cb, cerebellum; ctx, cortex; hc, hippocampus.

barbituric acid-reactive substances (Fig. 1B), the index of lipid peroxidation, in the cerebellum ($F_{12} = 2.22$, $P = 0.049$) and cerebral cortex ($F_{14} = 3.19$, $P = 0.007$) in protein-malnourished rats. Moreover, protein malnutrition significantly decreased levels of tryptophan and tyrosine in all tested brain structures (Fig. 2); decreased tryptophan content was observed in the hippocampus, cerebellum, and cerebral cortex ($F_{15} = 2.34$, $P = 0.044$; $F_{13} = 2.26$, $P = 0.043$; $F_{12} = 4.77$, $P = 0.001$, respectively), as was tyrosine content ($F_{15} = 2.83$, $P = 0.020$; $F_{13} = 2.25$, $P = 0.044$; $F_{12} = 4.71$, $P = 0.001$). It is important to note that the amounts of tyrosine and tryptophan were normalized by total protein level.

The effects of protein malnutrition on the antioxidant brain enzymes studied are presented in Fig. 3. SOD and GPx activities were unchanged in all studied structures, whereas CAT activity was significantly decreased only in the cerebellum ($\sim 35\%$, $F_{13} = 2.43$, $P = 0.032$). In addition, a significant decrease in TAR levels ($F_{13} = 2.43$, $P = 0.032$) was observed in the cerebral cortex of protein-malnourished rats (Fig. 4).

Discussion

The present results confirm the working hypothesis and support the idea that oxidative damage may be related to brain changes induced by protein malnutrition. There are only a few studies about oxidative stress in brain tissue of rats subjected to protein malnutrition. Caloric and/or protein

prenatal malnutrition has been reported to cause oxidative stress in extracerebral tissues by changes in antioxidant enzyme activity and/or antioxidant compounds in humans [23–25] and rats [26].

Severe protein malnutrition provoked long-lasting oxidative deleterious effects on macromolecules because it increased lipid peroxidation levels and significantly decreased tyrosine and tryptophan contents. Oxidative damage to lipids and proteins may be associated with numerous alterations in membrane structure, biochemical parameters, and functional activities such as membrane fluidity and mitochondrial dysfunction [11].

Although protein malnutrition can interfere with protein synthesis and structure and, hence, alter enzyme activity [1], our findings suggest that cerebral effects of malnutrition are not simply caused by protein deficiency. However, there is involvement of other altered parameters, including accumulated oxidative damage and decreased antioxidant activity.

We found that CAT activity was significantly decreased in the cerebellum of malnourish rats; this fact is important

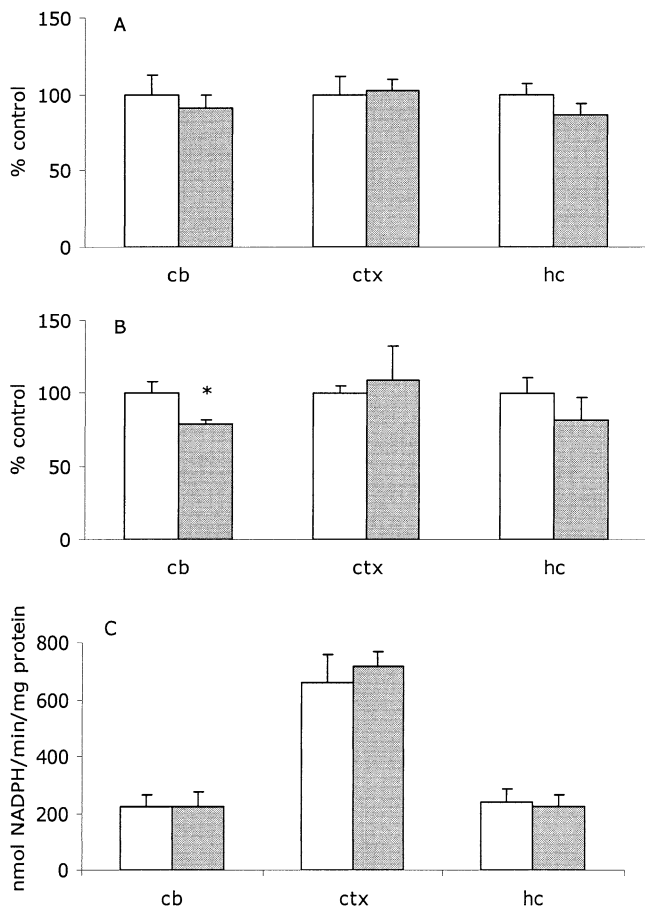


Fig. 3. Effects of protein malnutrition on activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (A), catalase (B), and glutathione peroxidase (C) of studied brain areas of control (whited bars) and protein-malnourished (gray bars) rats. Data expressed as mean \pm standard error of the mean of seven to eight animals per group (Student's *t* test, **P* < 0.05). cb, cerebellum; ctx, cortex; hc, hippocampus; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

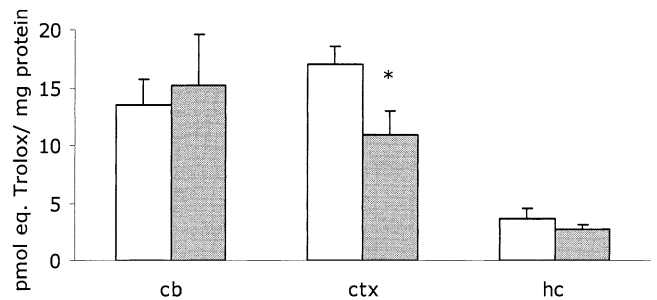


Fig. 4. Effects of protein malnutrition on total antioxidant reactivity levels from the studied brain areas of control (white bars) and protein-malnourished (gray bars) rats. Data expressed as mean \pm standard error of the mean of seven to eight animals per group (Student's *t* test, **P* < 0.05). cb, cerebellum; ctx, cortex; hc, hippocampus.

because accumulated H_2O_2 might generate hydroxyl radicals by the iron-catalyzed Fenton reaction or by the Haber-Weiss reaction [27].

In addition, TAR levels were decreased in the cerebral cortex. TAR is an index of the capacity of a given sample to modulate the damage associated with enhanced production of free radicals [18]. Alterations in TAR levels cannot be attributed to any known antioxidant because this index reveals the existence of unidentified and specifically unmeasured antioxidant molecules [19]. The lower TAR levels in the cerebral cortex of nourished rats may produce sensitivity to oxidative events in this brain area.

It is important to note that the cerebral cortex and cerebellum, which showed at least one altered antioxidant parameter, exhibited increased levels of lipid peroxidation as evaluated by testing with thiobarbituric acid-reactive substances. Brain lipid peroxidation affects membrane integrity and stability; therefore, cell membranes from malnourished animals, already altered under basal conditions, may be more sensitive when exposed to oxidative alterations. We used amino acid quantification methods as an index of protein damage and found a decrease in the content of tyrosine and tryptophan.

Interestingly, Manary et al. [8] suggested that oxidative stress is prevalent in children with kwashiorkor, based on the finding that urinary levels of oxidized amino acids, dityrosine and orthotyrosine, normalized to their precursors, tyrosine and phenylalanine, were increased in children with kwashiorkor. They further suggested that oxidatively damaged cytosolic or membrane-bound proteins could be the source of oxidized amino acids in urine. Our data show that the decreased amino acid residue content may result from significant oxidation in all tested brain areas, which might contribute to blood and urinary levels.

Because malnutrition, although it did not affect brain free radical content as assessed by DCF levels, changed antioxidant capacity in the cerebral cortex and CAT activity in the cerebellum, we propose that it induces impairment in the protein repair system.

In general, oxidative stress status leads to chemical al-

terations in amino acid residues from proteins, whose function might be compromised. Oxidation of amino acid residues from proteins increased susceptibility to proteolytic degradation. Another possibility is that oxidative damage promotes formation of protein aggregates, which are resistant to removal by proteinases. We hypothesize that the higher levels of oxidized proteins caused by severe malnutrition might occur through a decline in the proteolytic machinery, namely the proteasome, which is an important system responsible for the degradation of damaged proteins; alternatively, oxidized proteins strongly tends to aggregate and form covalent cross-links, preventing proteasome action and leading to accumulation of oxidized proteins [28]. Yin [29] suggested that the final step of the crosslinking process is the formation of a water-insoluble self-fluorescent material, which accumulates in aging cells.

In conclusion, our results show the existence of oxidative stress, an imbalance between free radical content and tested scavenging systems, in the cerebral cortex and cerebellum caused by protein malnutrition. In addition, decreased amino acid residue levels seem to be important in all tested brain areas, which may indicate an impairment of protein damage repair systems. Our data support the idea of prophylactic and therapeutic strategies to improve antioxidant status as coadjuvants in protein deficiency. More studies are necessary to determine the exact mechanism of malnutrition-induced protein damage.

References

- [1] Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26:471–83.
- [2] Grantham-McGregor S. A review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development. *J Nutr* 1995;125:2233S–8.
- [3] Rotta LN, Schmidt AP, Mello e Souza T, Nogueira CW, Souza KB, Izquierdo IA, et al. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem Res* 2003;28:1181–6.
- [4] Steiger JL, Galler JR, Farb DH, Russek SJ. Prenatal protein malnutrition reduces beta(2), beta(3) and gamma(2L) GABA(A) receptor subunit mRNAs in the adult septum. *Eur J Pharmacol* 2002;446:201–2.
- [5] Dobbing J, Hopewell JW. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. *Arch Dis Child* 1971;46:736–7.
- [6] Garcia-Ruiz M, Diaz-Cintra S, Cintra L, Corkidi G. Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Res* 1993;22:203–12.
- [7] Schonheit B, Haensel P. Effect of nonspecific malnutrition on spine morphology of lamina V pyramidal cells of the cingulate area of juvenile and adult rats. *J Hirnforsch* 1984;25:617–31.
- [8] Manary MJ, Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Increased oxidative stress in kwashiorkor. *J Pediatr* 2000;137:421–4.
- [9] Fechner A, Bohme C, Gromer S, Funk M, Schirmer R, Becker K. Antioxidant status and nitric oxide in the malnutrition syndrome kwashiorkor. *Pediatr Res* 2001;49:237–43.
- [10] Golden MH, Ramdath D. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. *Proc Nutr Soc* 1987;46:53–68.
- [11] Halliwell BH. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction? *Ann Neurol* 1992;32(suppl):S10–5.
- [12] Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:69–74.
- [13] Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993;49:577–87.
- [14] Sriram K, Pai KS, Boyd MR, Ravindranath V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res* 1997;21:44–52.
- [15] Bromont C, Marie C, Bralet J. Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 1989;20:918–24.
- [16] Bondy SC. Evaluation of free radical-initiated oxidant events within the nervous system. In: Perez-Polo JR, editor. *Methods in neuroscience*. Volume 30. San Diego: Academic Press; 1996:243–59.
- [17] Gusow K, Szabelski M, Rzeska A, Karolczak J, Sulowska H, Wiczek W. Photophysical properties of tyrosine at low pH range. *Chem Phys Lett* 2002;362:519–26.
- [18] Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med* 1995;18:153–8.
- [19] Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* 2001;388:261–6.
- [20] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
- [21] Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981;77:325–33.
- [22] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [23] Gupta P, Narang M, Banerjee BD, Basu S. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatr* 2004;4:14–21.
- [24] Fechner A, Bohme C, Gromer S, Funk M, Schirmer R, Becker K. Antioxidant status and nitric oxide in the malnutrition syndrome kwashiorkor. *Pediatr Res* 2001;49:237–43.
- [25] Tatli MM, Vural H, Koc A, Kosecik M, Atas A. Altered anti-oxidant status and increased lipid peroxidation in marasmic children. *Pediatr Int* 2000;42:289–92.
- [26] Rana S, Sodhi CP, Mehta S, Vaiphei K, Katyal R, Thakur S, Mehta SK. Protein-energy malnutrition and oxidative injury in growing rats. *Hum Exp Toxicol* 1996;15:810–4.
- [27] Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000;149:43–50.
- [28] Merker K, Grune T. Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence. *Exp. Gerontol* 2000;35:779–86.
- [29] Yin D. Studies on age pigments evolving into a new theory of biological aging. *Gerontology* 1995;41:159–72.

PARTE III

1. Discussão

Embora a seqüência dos principais eventos celulares no desenvolvimento do SNC esteja bem elucidada, os mecanismos bioquímicos que regem estes processos ainda necessitam ser melhor caracterizados, bem como os eventos patofisiológicos envolvidos nas alterações causadas pela desnutrição sobre o desenvolvimento. Os resultados deste trabalho corroboram com o conceito de que a desnutrição altera importantes parâmetros neuroquímicos.

Modelo de desnutrição proposto

Os nutrientes em geral exercem influências sobre o desenvolvimento cerebral. O conteúdo protéico da dieta é um dos componentes mais críticos no desenvolvimento das funções do SNC. Assim, o modelo de desnutrição utilizado no presente trabalho foi o de restrição protéica nos período pré-natal e pós-natal. O déficit nutricional foi induzido pela restrição de proteína a 7% na dieta das mães durante a gestação e o período lactacional, sendo caracterizada, portanto, pela restrição da quantidade total de nutrientes acessíveis aos filhotes (Pine et al. 1994; Passos et al. 2000). A opção pela fonte protéica, caseína, assim como a definição do percentual de proteína na composição da ração do grupo controle (25% de caseína) e grupo experimental (7% de caseína), consideraram a possibilidade de estabelecimento de comparativos com desenhos experimentais amplamente descritos na literatura (Gressens et al., 1997; Morgane et al., 1993 e 2002; Tonkiss et al., 1998 e

2000), incluindo os de nosso grupo de pesquisa (Schweigert et al., 2005; De Souza et al., 2004; Rotta et al., 2003). A restrição protéica utilizada neste trabalho causou uma acentuada redução no ganho de massa corporal e cerebral em ratos desnutridos ao nascimento e aos 60 dias, em consonância com dados da literatura e indicando a adequação do modelo proposto .

Alterações gliais ao nascimento

A desnutrição altera diferentemente a proliferação de neurônios e de células gliais, dependendo se o insulto nutricional ocorre durante o período embrionário, fetal, pós-natal precoce ou tardia. Por exemplo, a desnutrição pré-natal resulta em um déficit no número de células ao nascimento, principalmente macroneurônios, e uma permanente deficiência neuronal durante a vida pós-natal (Morgane *et al.*, 1993 e 2002).

Insultos impostos no período pré, perinatal ou pós-natal podem estar associados a efeitos deletérios sobre células gliais, especialmente os astrócitos, que estão envolvidos na diferenciação neuronal, no suporte metabólico de neurônios, captação de glutamato, secreção de fatores neurotróficos e defesa antioxidante (Takuma et al., 2004).

As proteínas GFAP e S100B são consideradas marcadores gliais. O aumento na expressão de ambas também está relacionado a injúrias, como a doença de Alzheimer, síndrome de Down e traumas (O'Callaghan, 1991; Eng e Lee, 2000; Eng 1985; Donato, 2001).

Gressens e colaboradores (1997) sugeriram um atraso na astrocitogênese, ao induzirem restrição protéica somente nas duas primeiras semanas de gestação, uma vez que encontraram uma redução de GFAP

durante o período pós-natal. Nosso trabalho (artigo 1), que utilizou o modelo de restrição protéica ao longo da gestação, constatou um aumento no imunoconteúdo de GFAP nas três estruturas estudadas (córtex cerebral, hipocampo e cerebelo) em ratos desnutridos de 2 dias, em favor da hipótese de que a gliogênese possa estar antecipada. Um perfil similar foi encontrado no imunoconteúdo de S100B no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, embora no hipocampo este aumento não tenha sido estatisticamente significativo.

Os efeitos da desnutrição sobre o desenvolvimento do SNC dependem do período de desenvolvimento em que esta é imposta. O atraso na gliogênese foi encontrado quando a restrição protéica não se estendeu até a terceira semana de gestação (Gressens et al., 1997), enquanto que a antecipação, observada em nosso estudo, pode estar relacionada à restrição protéica durante todo o período de gestação. No SNC de roedores, a neurogênese inicia por volta do 11º dia embrionário, tem seu pico no 15º dia e cessa ao nascimento, enquanto a grande maioria das células gliais (astrócitos e oligodendrócitos) é formada durante o período de desenvolvimento perinatal. É importante observar que o início da proliferação glial ocorre no final da última semana de gestação (Dobbing, 1971; Levistky e Strupp, 1995; Davidson e Dobbing, 1966; Morgane et al., 2002). Assim, os astrócitos são, temporalmente, gerados após a proliferação de neurônios (Namihira et al., 2004; Morgane et al., 2002). A inibição da gliogênese no período neurogênico envolve principalmente a metilação do DNA e a ativação de fatores de transcrição da via JAK-STAT (Fan et al., 2005; He et al., 2005). É importante salientar que esta via está inativa durante a fase inicial de neurogênese, quando fatores pró-neurogênicos estão altamente expressos, e torna-se fortemente ativada

durante o período perinatal (gliogênese) quando fatores neurogênicos estão reduzidos. Por exemplo, o aumento da expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) induz uma precoce diferenciação de astrócitos, pela ativação da via JAK-STAT (Sun, 2001; Viti et al., 2003). Assim, o controle desta via de sinalização e subsequente elevação da atividade da STAT são mecanismos chaves para o controle do tempo e magnitude da diferenciação astrogliol (Fan et al., 2005; Nahimira et al., 2004).

Estes dados sugerem que a desnutrição poderia, por meio da metilação e/ou da ativação da via JAK-STAT, alterar a diferenciação celular. Possivelmente a hipometilação do DNA e/ou a ativação/fosforilação das STATs anteciparia a gliogênese. Desta forma, a desnutrição pode levar à desorganização e eventual disfunção do SNC por alteração de etapas do desenvolvimento, inclusive das de gliogênese (He et al., 2005, Morgane et al., 2002).

Além dos resultados de GFAP e S100B, o aumento da atividade da glutamina sintetase (artigo 2), uma enzima também específica de astrócitos, aos 2 dias em ratos desnutridos reforça a idéia de que o insulto nutricional causou alterações nas seqüências de diferenciação, isto é, uma precoce astrogliogênese.

Alterações gliais no período de sinaptogênese:

Na tentativa de avaliar a ontogenia destes marcadores gliais em diferentes estruturas cerebrais, observamos uma diminuição do imunocontéudo de GFAP em ratos desnutridos de 15 dias (artigo 1), período em que ocorre intensa sinaptogênese e proliferação de células granulares, especialmente em

hipocampo e cerebelo (Morgane et al., 2002), sugerindo que nesta etapa tenha ocorrido um atraso na gliogênese nessas estruturas. Recente estudo mostrou diminuição da GFAP, medida por imunocitoquímica em núcleo supraquiasmático de animais desnutridos (Mendonça et al., 2004). Observamos, ainda, que em córtex cerebral de ratos desnutridos de 15 dias o aumento de GFAP e S100B se manteve, refletindo efeitos diferentes em cada uma das regiões cerebrais.

Dados encontrados referentes à ontogenia do conteúdo de glutatona (artigo 2) ratificam dados da literatura (Nanda et al., 1996). O aumento aos 15 dias, em ambos os grupos, indicam a relevância da comunicação metabólica neurônio – astrócitos, importante para a manutenção de glutatona no SNC. É conhecido que neurônios têm menor quantidade de glutatona do que células astrogliais e que a síntese de glutatona depende da disponibilidade e da captação da cisteína por astrócitos (Dringer et al., 1999 c e 1999d). Além disso, a observação ontogenética do aumento aos 15 dias pós-natal (em córtex e hipocampo) da atividade de glutamina sintetase (Mearow et al., 1989), tanto em normonutridos quanto em desnutridos, em comparação aos 2 e 60 dias reflete o desenvolvimento glial, já que o aumento da atividade desta enzima está associada à diferenciação astrocitária (Caldani et al., 1982; Patel et al., 1982; Suarez et al., 2002).

Alterações gliais na vida adulta:

Gressens e colaboradores (1997), ao induzir restrição protéica durante as duas primeiras semanas de gestação, observaram que os ratos na vida adulta apresentavam quase completa normalização dos parâmetros de

desenvolvimento cerebral (citoarquitetura, diferenciação neuronal e glial). Em ratos de 60 dias não observamos diferença no conteúdo de GFAP e S100B nas três estruturas estudadas, sugerindo que a desnutrição protéica durante o período de desenvolvimento embrionário induz múltiplas mas transitórias alterações no desenvolvimento cerebral. A normalização desses parâmetros reflete a importante plasticidade do cérebro em desenvolvimento e sua habilidade em adaptar-se ao estresse precoce severo (Gressens et al., 1997). Assim, a recuperação destes parâmetros parece manter-se em equilíbrio na desnutrição e podem se manifestar apenas em um momento de estresse emocional ou ambiental não usual (Morgane et al., 2002).

S100B no Líquor

A presença de S100B no líquido durante o desenvolvimento reflete predominantemente a secreção da proteína nas diversas regiões. Em cultura, uma secreção mais acentuada tem sido observada nas fases mais imaturas e pré-confluentes de astrócitos (Tramontina et al, 2002). Com a maturidade glial, há um aumento da expressão da S100B e, em paralelo, uma redução da quantidade secretada. Esta proteína extracelularmente tem sido associada a uma atividade trófica sobre a sinaptogênese. De acordo com isso, os níveis extracelulares elevados de S100B têm sido observados em neonatos humanos e de roedores. Esses níveis diminuem com o desenvolvimento (Tramontina et al., 2002; Netto et al., 2005).

Por outro lado, a relação do aumento dos níveis de S100B no líquido em situações de injúria do SNC está bem estabelecida (Rothermundt et al., 2003). Embora, o imunoc conteúdo de S100B em líquido tenha mostrado o mesmo perfil

ontogenético do que ratos normonutridos (artigo 1) , diminuindo com a idade, o aumento encontrado em ratos desnutridos aos 21 e 60 dias poderia sugerir um atraso na astrocitogênese (fato observado pela redução da GFAP aos 15 dias de ratos desnutridos em hipocampo e cerebelo).

Outro aspecto relevante a ser considerado é de que menos de 1% do conteúdo astrocítico de S100B é secretado (Tramontina et al., 2002). Desta forma, uma variação do conteúdo extracelular, não depende da variação significativa do conteúdo intracelular, ou seja, o aumento de S100B observado aos 21 dias no líquido não reflete necessariamente o aumento observado no córtex cerebral por volta desta idade. Além disso, aos 60 dias os níveis líquidos de S100B são mais elevados nos animais desnutridos, mas não o conteúdo intracelular da proteína nas três regiões analisadas.

Efeito da desnutrição protéica sobre o estado oxidativo e captação de glutamato

Recentes trabalhos têm mostrado os efeitos da desnutrição sobre os sistemas de neurotransmissão, comprovando alterações morfológicas e bioquímicas produzidas sobre estes sistemas (Wiggins et al., 1984; Rocha e Souza, 1994; Steiger et al., 2003). Estudos desenvolvidos em nosso laboratório mostram que a desnutrição altera alguns parâmetros do sistema glutamatérgico em ratos de 21 e 75 dias (Rotta et al., 2003). As células gliais, particularmente os astrócitos, são responsáveis pelo suporte metabólico de neurônios, que envolve a captação de glutamato e destinação desse aminoácido para consumo energético e síntese de glutamina e glutatona (Takuma et al., 2004)

Alterações no conteúdo de glutathione parecem ser sensíveis à gravidade do insulto nutricional. Li et al. (2002) não observaram diminuição dos níveis de glutathione no rim e encéfalo, ao induzirem restrição proteica (0,5% de proteína) em camundongos jovens por três semanas, enquanto níveis diminuídos foram encontrados no fígado, pulmões e coração. A manutenção dos níveis de glutathione em órgãos como cérebro e rins indica a proteção desses órgãos ao ataque dos radicais livres. Isto ressalta o conceito de que a gravidade dos efeitos da desnutrição sobre o desenvolvimento depende do tecido alvo, do tempo de duração e principalmente da etapa crítica em que o insulto ocorre (Kehoe et al., 2001).

Com o objetivo de avaliar o efeito da desnutrição sobre parâmetros metabólicos como a captação de glutamato e atividade da glutamina sintetase e também parâmetros de estresse oxidativo, verificou-se a diminuição do conteúdo de glutathione em córtex, hipocampo e cerebelo aos 2 dias e ,aos 15 dias, em córtex e cerebelo de ratos desnutridos, bem como a diminuição da captação de glutamato em córtex e hipocampo de ratos desnutridos de 2 dias. Esta diminuição foi acompanhada pela diminuição da reatividade antioxidante total (TAR) e atividade da glutathione peroxidase (GPx) em córtex e hipocampo de ratos de 2 dias, sugerindo uma diminuída capacidade antioxidante nestes animais. O mecanismo pelo qual acontecem estas alterações não foi testado, porém pode-se especular duas alternativas para explicá-lo:

- a) *Captação de cistina diminuída.* Considerando que cisteína é um aminoácido limitante para a síntese de glutathione, fatores que estimulam a captação de cisteína (na verdade, cistina) pelas células aumentam as concentrações intracelulares de glutathione (McBean e

Flynn, 2001). O principal sistema de transporte de cistina para o interior do astrócito na troca por glutamato é conhecido como sistema x_c^- (Danbolt, 2001). Alterações neste sistema provavelmente devem-se à elevação das concentrações de glutamato extracelular. Mais recentemente foi demonstrado um sistema de captação de cistina pelo transportador dependente de sódio (X_{AG}^-) (Allen et al, 2001), que é estimulado por baixas concentrações de glutamato extracelular. Assim, altas concentrações de glutamato inibem também este transporte (Had- Aissuoni et a., 2002). De acordo com os dados do experimento, a captação de glutamato está diminuída aos 2 dias em córtex e hipocampo no grupo desnutrido em comparação ao normonutrido, sendo possível inferir que a captação de cistina possa estar prejudicada. A observação na diminuição da captação de glutamato permite supor que este grupo estaria mais suscetível a excitotoxicidade do glutamato. Outras alterações como a diminuição da expressão da enzima limitante para a síntese de glutathione (γ -glutamyl-cisteína sintetase – GCS) ou diminuição da atividade da GCS, inibida por óxido nítrico (Wu et al., 2000) devem ser consideradas.

- b) *Mecanismo Compensatório – Aumento da Atividade da Glutamina Sintetase.* O aumento da atividade da glutamina sintetase nos animais desnutridos poderia ser um mecanismo compensatório à diminuída captação do glutamato, e conseqüentemente resultar em diminuição do conteúdo de glutathione. É bem conhecido que a glutamina serve como substrato para a síntese de aminoácidos,

principalmente o glutamato, bem como para a síntese de glutathione (Mates et al., 2002). Além disso, a glutamina é precursora da síntese de glicosamina. Ambas (glutamina e glicosamina) parecem inibir a produção de NADPH em células endoteliais (Wu et al., 2001). Contudo, o efeito da glutamina ou glicosamina ainda não está estabelecido na produção de NADPH em astrócitos.

De forma a contribuir para estas duas alternativas citadas acima, ainda poderíamos relacionar a diminuída captação de glutamato (e atividade da γ -glutamyltranspeptidase) ao estado de oxidação dos transportadores envolvidos (Trotti et al., 1997). A redução do conteúdo de glutathione pode estar associada à redução da captação de glutamato, uma vez que o estado redox de resíduos de cisteína na estrutura de transportadores deste aminoácido excitatório regula a sua atividade, sendo que a oxidação destes grupos tióis inibe o transporte de glutamato (Trotti et al., 1997).

Os dados referentes a parâmetros de estresse oxidativo, em ratos desnutridos aos 2 dias, indicam importantes alterações no sistema antioxidante, avaliadas pela redução da reatividade antioxidante total e pela diminuída atividade da enzima glutathione peroxidase. Contudo, em ratos nesta idade, não foram encontrados danos oxidativos em macromoléculas, lipídios e proteínas, observados, respectivamente, nos ensaios de TBARS e conteúdo de resíduos de tirosina e triptofano. Paradoxalmente, foi observada, nesta idade no grupo desnutrido, uma redução nos níveis de radicais livres (conteúdo de DCF formado), que

pode ser explicada pela redução da atividade da cadeia respiratória, observada por Olorunsogo (1992 e 1989).

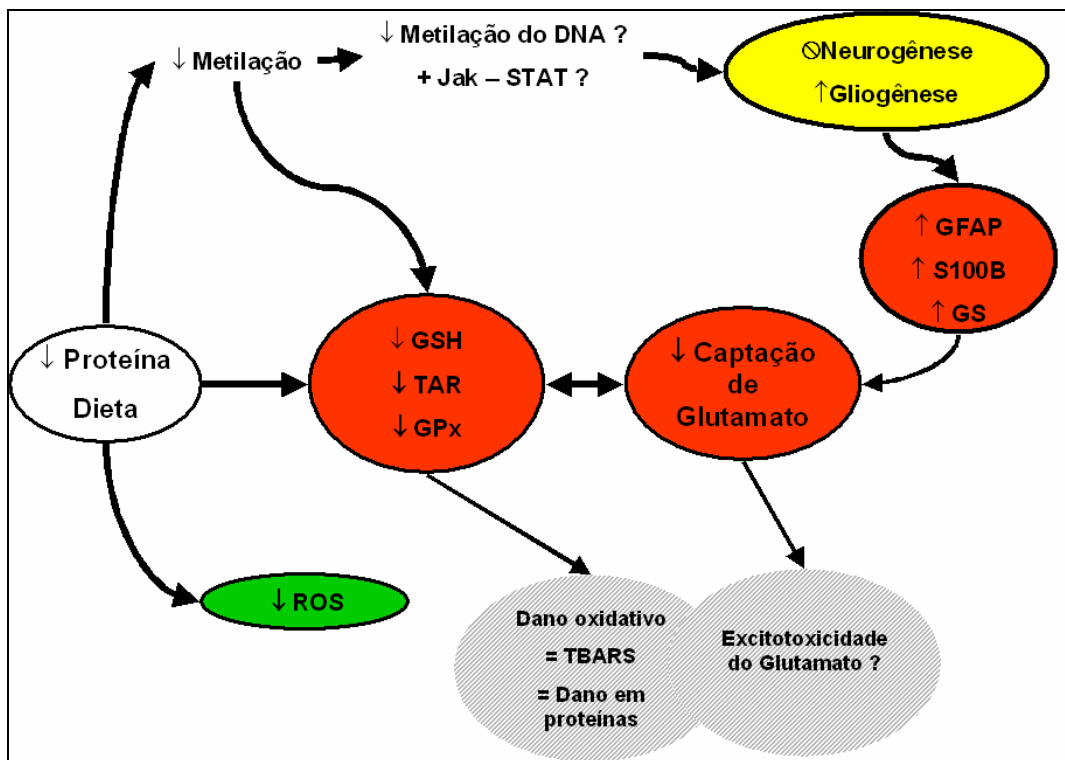


Figura 6: Sumário dos efeitos da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre as alterações bioquímicas gliais e estresse oxidativo no desenvolvimento do SNC de ratos de 2 dias.

Em ratos adultos de 60 dias, a desnutrição não alterou a captação de glutamato e a atividade da glutamina sintetase, o que pode estar relacionado ao fato de que a desnutrição também não afetou o conteúdo de glutatona. Embora tenhamos observado diminuída reatividade antioxidante total (TAR) somente em córtex cerebral de ratos desnutridos, o conteúdo de radicais livres não foi alterado nas três estruturas estudadas. Além disso, encontramos danos oxidativos: lipoperoxidação (córtex cerebral e cerebelo) e oxidação de resíduos de aminoácidos aromáticos (córtex cerebral, hipocampo e cerebelo). Considerando os dados referentes ao estado oxidativo nesta idade, podemos sugerir que, mesmo com a aparente recuperação do sistema

antioxidante (incluindo conteúdo de glutathione, enzimas antioxidantes a mesmo a captação de glutamato), a continuidade do insulto nutricional levou a danos oxidativos em lipídios e proteínas, indicando que a desnutrição ocasiona maior suscetibilidade ao estresse oxidativo.

A desnutrição protéica mostrou afetar parâmetros gliais e de estresse oxidativo em diferentes idades e em diferentes regiões do SNC. Quantitativamente, as maiores alterações foram transitórias e evidenciadas em um período de intensa proliferação e diferenciação celular do desenvolvimento. Contudo, avaliamos também que a continuidade do insulto resultou em danos qualitativamente importantes.

O caráter transitório das alterações em importantes parâmetros neuroquímicos não indica necessariamente uma completa recuperação, revela sim a enorme capacidade de adaptação da vida a adversidade. Entretanto, outros estudos investigando a suscetibilidade e a capacidade de resposta a outras injúrias do SNC em animais desnutridos nos permitirão compreender os efeitos subliminares da desnutrição protéica.

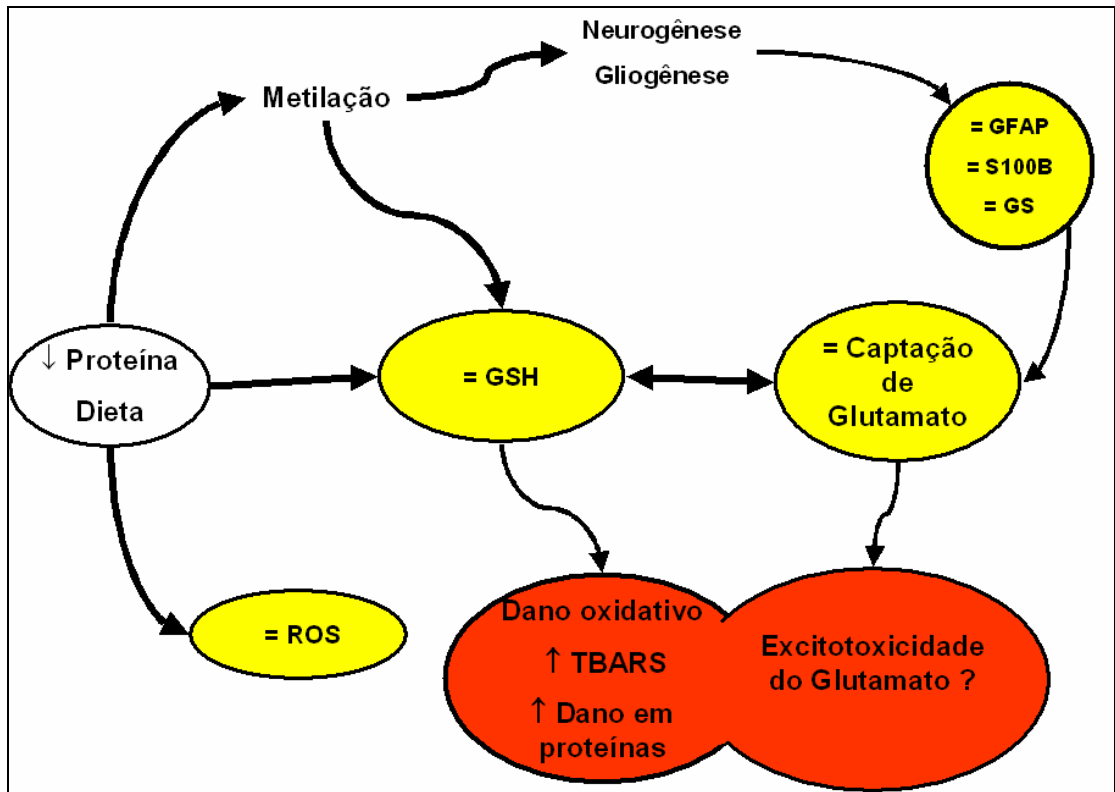


Figura 7: Sumário dos efeitos da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre alterações bioquímicas gliais e estresse oxidativo no desenvolvimento do SNC de ratos de 60 dias.

2. Conclusões

- A desnutrição protéica causou uma acentuada redução no ganho de massa corporal e cerebral em ratos aos 2, 15 e 60 dias;
- Ratos desnutridos de 2 dias apresentaram aumento no imunoconteúdo da GFAP em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo;
- Ratos desnutridos de 15 dias apresentaram aumento no imunoconteúdo de GFAP em córtex cerebral, mas redução em hipocampo e cerebelo, no entanto, aos 60 dias não foi observada diferença em nenhuma estrutura estudada;
- Ratos desnutridos de 2 dias apresentaram aumento no imunoconteúdo da S100B em córtex cerebral e cerebelo; esse aumento também ocorreu no hipocampo, embora este dado não tenha sido estatisticamente significativo;
- Em córtex cerebral de ratos 15 dias, a desnutrição causou aumento no imunoconteúdo de GFAP e S100B, esta alteração pode estar relacionada à vulnerabilidade das diferentes regiões cerebrais já que, no hipocampo e cerebelo a desnutrição causou uma redução no imunoconteúdo de GFAP.
- A desnutrição pré e pós-natal não alterou o imunoconteúdo de GFAP e S100B em nenhuma estrutura estudada aos 60 dias;
- A desnutrição protéica pré e pós-natal não alterou o perfil ontogenético da S100B no líquor, mas aumentou em relação ao grupo normonutrido aos 21 e 60 dias;

- O conteúdo de glutathione foi menor em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos desnutridos; aos 15 dias essa redução ocorreu no córtex cerebral e cerebelo, mas não em hipocampo;
- A desnutrição não alterou o conteúdo de glutathione aos 60 dias nas estruturas estudadas;
- O perfil ontogenético da glutathione foi observado pelo aumento aos 15 dias em córtex cerebral e hipocampo, bem como a atividade da glutamina sintetase em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo nesta mesma idade, nos grupos normonutridos e desnutridos.
- A reatividade antioxidante total foi diminuída em ratos desnutridos aos 2 dias em córtex cerebral e hipocampo e aos 60 dias no córtex cerebral;
- Em ratos desnutridos de 2 dias houve redução do conteúdo de radicais livres em córtex cerebral e hipocampo, corroborando a idéia de que a desnutrição causa diminuição da atividade da cadeia respiratória e conseqüente redução de espécies reativas de oxigênio. Esse parâmetro não foi alterado aos 60 dias;
- A desnutrição não causou aumento da lipoperoxidação em cérebro de ratos aos 2 dias. Porém a continuidade do insulto causou aumento desse parâmetro em córtex cerebral e cerebelo aos 60 dias;
- O parâmetro indicativo de dano em proteínas, oxidação de resíduos tirosina e triptofano, foi alterado pela desnutrição. Os

ratos desnutridos de 60 dias apresentaram redução do conteúdo de tirosina e triptofano em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo;

- A atividade da enzima SOD não foi alterada pela desnutrição;
- A atividade da catalase foi alterada somente em ratos desnutridos aos 60 dias;
- A desnutrição causou diminuição na captação de glutamato em córtex cerebral e hipocampo aos 2 dias e em hipocampo aos 15 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Keiegestein J. S100beta protects cultured neurons against glutamate and staurosporine – induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5Ht (1A)– Receptor agonist, BayX 3702. *Brain Res.*; 858(1):121-28, 2000.

Allen JW, Shanker G, Aschner M. Methylmercury inhibits the in vitro uptake of glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. *Brain Res.*; 894(1):131-40.

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol.*; 126(3):337-89, 1966.

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 U S A.*; 94(8):4155-60, 1997.

Barger SW, Van Eldik LJ, Mattson MP. S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation. *Brain Res.*; 677(1):167-70, 1995.

Batista Filho, M, Rissin, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad Saúde Pública*; 19(Sup.1):S181-S91, 2003.

Bonatto F, Polydoro M, Andrades ME, da Frota Junior ML, Dal-Pizzol F, Rotta LN, Souza DO, Perry ML, Moreira JC. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res.*; 1042(1): 17-22, 2005.

BRASIL. Conselho de Segurança Alimentar e Nutricional (Consea). Princípios e Diretrizes de uma política de Segurança Alimentar e Nutricional. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL, Brasília, Brasil, 2004. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/consea/static/documentos/LivroConsea_DocumentoReferencia.pdf Acessado em 23 de dezembro de 2005.

Caldani M, Rolland B, Fages C, Tardy M. Glutamine synthetase activity during mouse brain development. *Experientia*; 38(10):1199-202, 1982.

Castellano C, Cestari V, Ciamei A. NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr Drug Targets*; 2(3):273-83, 2001.

Chase HP, Dabiere CS, Welch NN, O'Brien D. Intra-uterine undernutrition and brain development. *Pediatrics*; 47(3):491-500, 1971.

Chow BF. Effect of maternal dietary protein on anthropometric and behavioral development of the offspring. *Adv Exp Med Biol.*; 49(0):183-219, 1974.

Cintra L, Aguilar A, Granados L, Galvan A, Kemper T, DeBassio W, Galler J, Morgane P, Duran P, Diaz-Cintra S. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. *Hippocampus*; 7(2):192-203, 1997.

Conn PJ, Pinn JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.*; 37:205-37, 1997.

Cooper AJ, Kristal BS. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem.*; 378(8):793-802, 1997.

Croskerry PG, Smith GK, Shepard BJ, Freeman KB. Perinatal brain DNA in the normal and growth hormone-treated rat. *Brain Res.*; 52:413-18, 1973.

Daikhin Y, Yudkoff M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr.*; 130(4S Suppl):1026S-31S, 2000.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Pro Neurobiol.*; 65(1):1-105, 2001.

Davidson AN, and Dobbin J. Myelination as a vulnerable period in brain development. *Brit Med Bull.*; 22:40-4, 1966.

De Souza KB, Feoli AM, Kruger AH, De Souza MR, Perry CT, Rotta LN, Souza DO, Perry ML. Effects of undernutrition on glycine metabolism in the cerebellum of rats. *Ann Nutr Metab.*; 48(4):246-50, 2004.

Diaz-Cintra S, Garcia-Ruiz M, Corkidi G, Cintra L. Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res.*; 662(1-2):117-26, 1994.

Dobbing J. Effect of nutrition on the development of the nervous system. *Indian J Med Res.*; 59(6Suppl):177-86, 1971.

Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.*; 33: 637-668, 2001.

Dringer R. Metabolism and function of glutathione in brain. *Pro Neurobiol.*; 62(6):649-71, 2000a.

Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem.*; 267:4912-16, 2000b.

Dringen R, Kussmaul L, Gutterer JM, Hirrlinger J, Hamprecht B. The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem.*; 72(6):2523-30, 1999c.

Dringer R, Pfeiffer B, Hamprecht B. Synthesis of the Antioxidant Glutathione in Neurons: Supply by Astrocytes of CysGly as Precursor for Neuronal Glutathione. *Neurosci.*; 15:562-69, 1999d.

Eng LF, Ghimikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.*; 25(9-10):1439-51, 2000.

Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol.*; 8(4-6): 203-14, 1985.

Erecinska M, Cherian S, Silver IA. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol.*; 73(6):397-445, 2004.

Erecinska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Pro Neurobiol.*; 35(4): 245-96, 1990.

Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.*; 375(6532): 599-03, 1995.

Fan G, Martinowich K, Chin MH, He F, Fouse SD, Hutnick L, Hattori D, Ge W, Shen Y, Wu H, ten Hoeve J, Shuai K, Sun YE. DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development.*; 132(15):3345-56, 2005.

Fano G, Mariggio MA, Angelella P, Nicoletti I, Antonica A, Fulle S, Calissano P. The S-100 protein causes an increase of intracellular calcium and death of PC12 cells. *Neuroscience.*; 53(4):919-25, 1993.

Fechner A, Böhme CC, Gromer S, Funk M, Schirmer RH and Becker K. Antioxidant Status and Nitric Oxide in the Malnutrition Syndrome Kwashiorkor. *Pediatr Res.*; 49:237-43, 2001.

Fiacco TA, Rosene DL, Galler JR, Blatt GJ. Increased density of hippocampal kainate receptors but normal density of NMDA and AMPA receptors in a rat model of prenatal protein malnutrition. *J Comp Neurol.*; 456(4):350-60, 2003.

Gegelashvili G, Robinson MB, Trotti D, Rauen T. Regulation of glutamate transporters in health and disease. *Pro Brain Res.*; 132:267-86, 2001.

Golden MH, Ramdath D. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. *Proc Nutr Soc.*; 46(1):53-68, 1987.

Golden MH. The development of concepts of malnutrition. *J Nutr.*; 132(7):2117S-22S, 2002.

Gonçalves DS, Lenz G, Karl J, Gonçalves CA, Rodnight R. Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures. *Neuroreport.*; 11(4):807-9, 2000.

Granados-Rojas L, Larriva-Sahd J, Cintra L, Gutierrez-Ospina G, Rondan A, Diaz-Cintra S. Prenatal protein malnutrition decreases mossy fibers-CA3 thorny excrescences asymmetrical synapses in adult rats. *Brain Res.*; 933(2):164-71, 2002.

Gressens P, Muaku SM, Besse L., Nsegbe E, Gallego J, Delpech B, Gaultier C, Evrard P, Ketelslegers JM, Maiter D. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Dev Brain Res.*; 103(1):21-35, 1997.

Had-Aissouni L, Re DB, Nieoullon A, Kerkerian-Le Goff L. Importance of astrocytic inactivation of synaptically released glutamate for cell survival in the central nervous system--are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? *J Physiol Paris.*;96(3-4):317-22, 2002.

Hall A, Khanh LN, Son TH, Dun NQ, Lansdown RG, Dar DT, Hanh NT, Moestue

H, Khoi HH, Bundy DA. Partnership for Child Development. An association between chronic undernutrition and educational test scores in Vietnamese children. *Eur J Clin Nutr.*; 55(9):801-4, 2001.

Hall AG. The Role of Glutathione in the Regulation of Apoptosis. *Eur J Clin Invest.*; 29(3):238-245, 1999.

Halliwell B, Clement MV, Lon LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*; 486(1):10-13, 2000.

Halliwell BH. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction? *Ann Neurol.*; 32:S10-5, 1992.

He F, Ge W, Martinowich K, Becker-Catania S, Coskun V, Zhu W, Wu H, Castro D, Guillemot F, Fan G, de Vellis J, Sun YE. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat Neurosci.*;8(5):616-25, 2005.

Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell.*; 97(7):889-01, 1999.

Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem.*; 271(5):2543-7, 1996.

Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem.*; 69(6):2294-301, 1997.

Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite out growth and cell survival by amphotericin and S100

proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.*; 275(51):40096-105, 2000.

Joshi S, Garole V, Daware M, Girigosavi S, Rao S. Maternal Protein Restriction Before Pregnancy Affects Vital Organs of Offspring in Wistar Rats. *Metabolism*; 52(1):13-18, 2003.

Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*; 360(6403):467-71, 1992.

Kawaguchi Y, and Hama K. Physiological heterogeneity of non-pyramidal cells in rat hippocampal CA1 region. *Exp Brain Res.*; 72(3):494-02, 1988.

Kehoe P, Mallinson K, Bronzino J, McCormick CM. Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness. *Dev Brain Res.* 132(1):23-31, 2001.

Levitsky DA, and Strupp B. Malnutrition and Brain: Chan in Concepts, Chan in Concerns. *J Nutr.*; 125(8 Suppl):2212S:2220S, 1995.

Li J, Wan H, Stoner GD, Bray TM. Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein- malnourished mice. *J Nutr Biochem.*; 13(10): 625-633, 2002.

Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul.*; 36:95-116, 2000.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I, Asenjo M, Marquez J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol.*; 34(5):439-58, 2002.

McBean GJ, and Flynn J. Molecular mechanisms of cystine transport. *Biochem Soc Trans.*; 29(6):717-22, 2001.

Mearow KM, Mill JF, Vitkovic L. The ontogeny and localization of glutamine synthetase gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.*; 6(4):223-32, 1989.

Meister A. Glutathione, metabolism and function via the gamma-glutamyl cycle. *Life Sci.*; 15(2):177-90, 1974.

Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.*; 130(4S Suppl):1007S-15S, 2000.

Mendonça JE, Vilela MC, Bittencourt H, Lapa RM, Oliveira FG, Alessio ML, Guedes RC, De Oliveira Costa MS, Da Costa BL. GFAP expression in astrocytes of suprachiasmatic nucleus and medial preoptic area are differentially affected by malnutrition during rat brain development. *Nutr Neurosci.*; 7(4):223-34, 2004.

Misra I, and Griffith OW. Expression and purification of human gamma-glutamylcysteine synthetase. *Protein Expr Purif.*; 13(2):268-76, 1998.

Montanha-Rojas EA, Ferreira AA, Tenorio F, Barradas PC. Myelin basic protein accumulation is impaired in a model of protein deficiency during development. *Nutr Neurosci.*; 8(1):49-56, 2005.

Monteiro CA, Mondini L, de Souza AL, Popkin BM. The nutrition transition in Brazil. *Eur J Clin Nutr.*; 49(2):105-13, 1995.

Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.*; 17(1):91-128, 1993.

Morgane PJ, Mokler DL, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev.*; 26(4):471-83, 2002.

Namihira M, Nakashima K, Taga T. Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in a immature astrocyte specific gene promoter. *FEBS Lett.*; 572(1-3):184-8, 2004.

Nanda D, Tolputt J, Collard KJ. Changes in brain glutathione levels during postnatal development in the rat. *Brain Res Dev Brain Res.*; 94(2):238-41, 1996.

Netto CB, Portela LV, Ferreira CT, Kielin C, Matte U, Felix T, da Silveira TR, Souza DO, Gonçalves CA, Giugliani R. Ontogenetic changes in serum S100B in Down syndrome patients. *Clin Biochem.*; 38(5):433-5, 2005.

Nicholls D, and Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci.*; 11(11):462-8, 1990.

O'Callaghan JP. Assessment of neurotoxicity: use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomed Environ Sci.*; 4(1-2):197-206, 1991.

Olorunsogo OO. Changes in brain mitochondrial bioenergetics in protein-deficient rats. *Br J Exp Pathol.*; 70(6):607-19, 1989.

Olorunsogo OO. Defective mitochondrial cation transport during dietary protein deficiency in rats. *Afr J Med Med Sci.*; 21(1):23-31, 1992.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Pro Neurobiol.*; 54(5):581-618, 1998.

Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res.*; 20(1):1603-12, 2000.

Patel AJ, Hunt A, Gordon RD, Balazs R. The activities in different neural cell types of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation glutamate. *Brain Res.*; 256(1):3-11, 1982.

Partadiredja G, Simpson R, Bedi KS. The effects of pre-weaning undernutrition on the expression levels of free radical deactivating in the mouse brain. *Nutr Neurosc.*; 8(3):183-93, 2005.

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

Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, Stella N, Magistretti PJ. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci.*; 20(4-5):291-9, 1998.

Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN. Programming of Intermediary Metabolism. *Mol and Cell Endocrinol.*; 185(1-2):81-91, 2001.

Pine AP, Jessop NS, Allan GF, Oldham JD. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. 3. The effects of dietary protein restriction and stages of lactation on milk composition. *Br J Nutr.*; 72(6):815-30, 1994.

Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhan Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeber E, Kanner BI. Cloning and expression of a rat brain L- glutamate transporter. *Nature*; 360(6403):464-7, 1992.

Popkin BM, Keyou G, Zhai F, Guo X, Ma H, Zohoori N. The nutrition transition in China: a cross-sectional analysis. *Eur J Clin Nutr.*; 47(5):333-46, 1993.

Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of meta-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 98(1):69-74, 2001.

Richman PG, Meister A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem.*; 250(4):1422-6, 1975.

Rocha JB, and Souza DO. Effects of undernutrition during suckling and early post-weaning on the inhibition by met-enkephalin of striatal adenylate cyclase activity in adult rats. *Pharmacol Toxicol.*; 75(5):321-3, 1994.

Rodier PM. Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Dev Med Child Neurol.*; 22(4):525-45, 1980.

Rodnight R, Gonçalves CA, Wofchuk ST, Leal R. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res.*; 30(3):325-38, 1997.

Rosso P. Regulation of food intake during pregnancy and lactation. *Ann N Y Acad Sci.*; 499:191-6, 1987.

Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.*; 60(6):614-32, 2003.

Rotta LN, Da Silva CG, Perry ML, Trindade VM. Undernutrition decreases serine palmitoyltransferase activity in developing rat hypothalamus. *Ann Nutr Metab.*; 43(3):152-8, 1999.

Rotta LN, Nogueira CW, da Silva L, Soares FA, Perry ML, Souza DO. Effect of undernutrition on GMP-PNP binding and adenylate cyclase activity from rat brain. *Cell Mol Neurobiol.*; 22(3):365-72, 2002.

Rotta LN, Schmidt AP, Mello e Souza T, Nogueira CW, Souza KB, Izquierdo IA, Perry ML, Souza DO. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. *Neurochem Res.*; 28(8):1181-6, 2003.

Rotta LN. Efeito da má nutrição protéica sobre parâmetros glutamatérgicos em SNC de ratos. Tese de Doutorado. Porto Alegre, 2003.

Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med.*; 78(1):3-13, 2000.

Schweigert ID, de Oliveira DL, Scheibel F, da Costa F, Wofchuk ST, Souza DO, Perry ML. Gestational and postnatal malnutrition affects sensitivity of young rats to picrotoxin and quinolinic acid and uptake of GABA by cortical and hippocampal slices. *Brain Res Dev Brain Res.*; 154(2):177-85, 2005.

Segovia G, Porrás A, Del Arco A, Mora F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Agein Dev.*; 122(1):1-29, 2001.

Sparre T, Reusens B, Cherif H, Larsen MR, Roepstorff P, Fey SJ, Larsen PM, Remacle C, Nerup J. Intrauterine Programming of Fetal Islet Gene Expression in Rats – Effects of Maternal Protein Restriction During Gestation Revealed by Proteome analysis. *Diabetologia*; 46(11):1497-1511, 2003.

Steiger JL, Alexander MJ, Galler JR, Farb DH, Russek SJ. Effects of prenatal malnutrition on GABA_A receptor alpha1, alpha3 and beta2 mRNA levels. *Neuroreport.*; 14(13):1731-5, 2003.

Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 89(22):10955-9, 1992.

Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int.*; 41(2-3):123-42, 2002.

Sun Y. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell.*; 104(3):365-76, 2001.

Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Pro Neurobiol.*; 72(2):111-27, 2004.

Tonkiss J, Almeida SS, Galler JR. Prenatally malnourished female but not male rats show increased sensitivity to MK-801 in a differential reinforcement of low rates tasks. *Behav Pharmacol.*; 9(1):49-60, 1998.

Tonkiss J, Galler J, Morgane PJ, Bronzino JD, Austin-LaFrance RJ. Prenatal protein malnutrition and postnatal brain function. *Ann N Y Acad Sci.*; 678:215-27, 1993.

Tonkiss J, Galler JR. Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. *Behav Brain Res.*; 40(2):95-107, 1990.

Tramontina F, Conte S, Gonçalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, Salbego C, Gonçalves CA. Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell Mol Neurobiol.*; 22(3):373-8, 2002.

Trotti D, Rizzini BL, Rossi D, Haugeto O, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A. Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur J Neurosci.*; 9(6):1236-43, 1997.

Van Eldik LJ, Christie-Pope B, Bolin LM, Shooter EM, Whetsell WO Jr. Neurotrophic activity of S-100 beta in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res.*; 542(2):280-5, 1991.

Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.*; 21(3-4):97-108, 2003.

Vesce S, Bezzi P, Volterra A. The highly integrated dialogue between neurons and astrocytes in brain function. *Sci Pro.*; 82 (3):251-70, 1999.

Viti J, Feathers A, Phillips J, Lillien L. Epidermal growth factor receptors control competence to interpret leukemia inhibitory factor as an astrocyte inducer in developin cortex. *J Neurosci.*; 23(8):3385-93, 2003.

Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A. Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev Neurosci.*; 17(4):203-11, 1995.

WHO. World Health Organization. Nutrition for Health and Development A global agenda for combating malnutrition, 2000. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_NHD_00.6.pdf Acessado em 28 de dezembro de 2005.

WHO/FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Eradicating world hunger – key to achieving the Millennium Development Goals The State of Food Insecurity in the World, Rome, 2005. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/a0200e/a0200e00.pdf> Acessado em 28 de dezembro de 2005.

WHO/FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Incorporating Nutrition: Considerations into Development Policies and Programmers Brief for Policy-makers and Programme. Planners in developing countries nutrition Planning ,assessment and evaluation service food and nutrition division food and agriculture organization of the united nations. Rome, 2004. Disponível em <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5343e/y5343e00.pdf> Acessado em 28 de dezembro de 2005.

Wiggins RC, Fuller G, Enna SJ. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. *Life Sci.*; 35(21):2085-94, 1984.

Winick M. Nutrition and nerve cell growth. *Fed Proc.*; 29(4):1510-5, 1970.

Wu G, Fan YZ, Yan S, Lupton J, Turner N. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr.*; 134(3):489-92, 2004.

Ziegler DR, Innocente CE, Leal RB, Rodnight R, Gonçalves CA. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Res.*; 23(10):1259-63, 1998.