

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO

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

VIVIAN SARMENTO DE VASCONCELOS

MACEIÓ

2009

VIVIAN SARMENTO DE VASCONCELOS

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Ximenes da Silva

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

MACEIÓ

2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- V331p Vasconcelos, Vivian Sarmiento de.
Expressão do transportador de glicose GLUT13 e atividade da acetilcolinesterase em cérebro de ratos adultos submetidos à desnutrição no início da vida / Vivian Sarmiento de Vasconcelos, 2009.
80 f : il.
- Orientadora: Adriana Ximenes da Silva.
Co-Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes.
Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas.
Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2009.
- Inclui bibliografia e anexos.
1. Desnutrição. 2. Metabolismo cerebral. 3. Transportadores de glicose.
4. Acetilcolinesterase. I. Título.

CDU: 612.39



MESTRADO EM NUTRIÇÃO
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas



Campus A. C. Simões
BR 104 Km 14 Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/ fax: 81 3214-1160

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO

**"Expressão do transportador de glicose GLUT3 e atividade da
acetilcolinesterase em cérebro de ratos adultos submetidos à
desnutrição no início da vida"**

por

Vivian Sarmiento de Vasconcelos

A Banca Examinadora, reunida aos 28 dias do mês de abril do ano de
2009, considera a candidata **APROVADA**.

Adriana Ximenes da Silva

Prof. Dra. Adriana Ximenes da Silva
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/UFAL

Suzana Lima de Oliveira

Profa. Dra. Suzana Lima de Oliveira
Faculdade de Nutrição/UFAL

Roberta Lima

Profa. Dra. Roberta Lima
Departamento de Fisiologia/UNCISAL

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO GERAL

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

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

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

GENERAL ABSTRACT

The protein-energy malnutrition is one of the most serious nutritional problems that occur in developing countries. The energy and nutritional deficiency in early life can cause significant changes in different stages of development of central nervous system, since the cases of hyperplasia, hypertrophy and myelinization occur in more intense. The brain uses glucose as its main energy substrate. However, under certain physiological conditions, as during the weaning or during prolonged fasting, the cells may use other substrates in order to meet their metabolic needs. The transport of glucose to the nerve cells requires the presence of specific transporter proteins called GLUT's (Glucose Transporters) to perform the transport of glucose by facilitated diffusion. Besides the transporters of glucose, transporter proteins of monocarboxylates (MCTs) are responsible for neuronal influx of lactate, MCT1 being the main responsible for providing energy to neurons during maturation of nervous tissue. The acetylcholine is a major neurotransmitter of the nervous system and is associated with the maintenance processes of attention, learning and memory. In the synaptic cleft acetylcholine is degraded by the enzyme cholinesterase, the acetylcholinesterase (AChE) and the butyrylcholinesterase (BuChE). Increased activity of fractions of AChE has been associated with states of dementia in elderly patients and the loss of cognitive function in patients with Alzheimer's Disease. This work is proposed to study the expression of neuronal glucose transporter GLUT3 and activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in brain of young adult rats (84 days of life) who were breastfed in litters formed by 6 (control group) or 12 pups (undernourished group). The results showed that the weight of the brains of malnourished rats was significantly lower ($P < 0.0001$, Student's t test) compared to controls. The blood glucose levels and the expression of GLUT3 in total cortical membranes was also reduced by malnutrition ($P < 0.0001$, Student's t test). The activity of AChE in different brain homogenate showed a significant interaction ($P = 0.0019$, two-way ANOVA, Tukey's test) between nutritional status and the type of fraction of the homogenate, with a significant reduction ($p < 0.05$) in activity this enzyme in the brain homogenate in control group. These results show for the first time that malnutrition during the period of weaning reduces the expression of GLUT3 and

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

Keywords: malnutrition, cerebral metabolism, glucose transporters, acetylcholinesterase

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Níveis de garantia para dieta Labina®	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach – Acetilcolina

AChE- Acetilcolinesterase

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

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA - *bovine serum albumin*

BuchE – Butirilcolinesterase

CO – Citocromo Oxidase

DA – Depressão Alastrante

DAG – Diacilglicerol

EAAT – *Excitatory Amino-Acid Transporters*

GLAST – Transportador de L-glutamato/L-aspartato

GLUT – *Glucose Transporter*

HC – homogenado de células

HCC – homogenado de células centrifugado

HCLT – homogenado livre de células com triton

IP3 – Trifosfato de Inositol

LTP – Potencias de Longa Duração

MCT – Transportadores de Monocarboxilato

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NMDA – N-metil-D-aspartato

PBS- *phosphate-buffered saline*

PBST - *phosphate-buffered saline triton*

PKC – Proteína Kinase C

SNC – Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

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

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