

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO SOBRE A ATIVIDADE  
DA SERINA PALMITOILTRANSFERASE  
E SOBRE A SÍNTESE  
DE ESFINGOLIPÍDIOS  
EM HIPOTÁLAMOS DE RATOS**

LIANE NANJI ROTTA

Orientadora: Profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade

Dissertação apresentada ao Curso de pós-  
Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica,  
para a obtenção do título de Mestre.

PORTO ALEGRE  
1997



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CB: BIOQUÍMICA

A T E S T A D O

Atestamos, para os devidos fins, que **LIANE NANCY ROTTA** concluiu todos os créditos junto ao CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA da UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL e sua dissertação de mestrado: "*Efeitos da Desnutrição sobre a Atividade da Enzima Serina Palmoiltransferase e sobre a Síntese de Esfingolipídios em Hipotálamos de Ratos*", orientada pela professora VERA MARIA TREIS TRINDADE, foi **APROVADA**, nesta data, pela Banca Examinadora composta pelos professores CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO e ELENA AIDA BERNARD (ambas do Departamento de Bioquímica-ICBS/UFRGS) e ROSELIS S. MARTINS DA SILVA (Departamento de Fisiologia-ICBS/UFRGS), com o conceito final "**A**".

Porto Alegre, 30 de abril de 1997.



*Diego Souza*  
Prof. DIOGO JOFRE GOMES DE SOUZA  
COORDINADOR DO CURSO  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BIOQUÍMICA  
UFRGS - P. A.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a possibilidade de realização deste trabalho, especialmente à minha professora orientadora, Dra. Vera Maria Treis Trindade, pelo seu empenho, presença constante, dedicação, ética profissional, conhecimento científico e pela oportunidade de minha formação profissional como recurso humano na universidade.

Aos meus pais Laurecy e Zeno, e ao meu irmão Humberto, pela minha formação, pelo estímulo, carinho e compreensão a mim dispensados durante o período de realização deste estudo.

Aos meus colegas do Laboratório Santa Cruz, pelo incentivo, colaboração e apoio, em especial ao Fernando Mossmann e à Maristela Brandalise, amiga e colega de extrema dedicação.

À Cristiani Gomes da Silva, bolsista de iniciação-científica deste projeto, pela sua participação ativa, pela competente ajuda e colaboração indispensável nos experimentos, e pela sua amizade.

Aos demais bolsistas de iniciação-científica do nosso laboratório, pelo seu apoio, convivência e amizade: Rafael, Cláudia, Tula, Diogo e Sandra.

Ao prof. Perry, pela sua colaboração na realização das cesáreas em ratas-gestantes, nos experimentos com animais fetais.

À prof. Elena A. Bernard, pelas sugestões e conversas de cunho científico acerca da realização deste trabalho.

À prof. Christiane Salbego pelo auxílio no uso dos densitômetros.

À tia Neca e ao Gilmar, meu primo, pela receptividade oferecida na minha vinda à Porto Alegre.

Ao Éverton Krabbe, pelo seu auxílio no estudo estatístico.

Aos diversos laboratórios do Departamento de Bioquímica, que colaboraram com o empréstimo de materiais necessários para a realização da parte experimental deste trabalho.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, pela oportunidade e aos funcionários do Departamento de Bioquímica, pelos seus préstimos, a nível de ratário, manutenção de equipamentos e secretaria.

Aos órgãos financiadores deste trabalho: CNPq, FAPERGS, FINEP e PROPESP-UFRGS.

À BLANVER Farmoquímica Ltda. e à ROCHE do Brasil, pela microcel-celulose e pela mistura vitamínica, que foram gentilmente doadas para a realização deste trabalho.

A todos familiares, amigos, colegas e professores que direta ou indiretamente me incentivaram e colaboraram para a realização deste trabalho, possibilitando esta conquista.

## RESUMO

Esfingolipídios são compostos envolvidos na sinaptogênese, mielinização, transdução sináptica e oncogênese. A síntese de esfingolipídios inicia no retículo endoplasmático, através da condensação de serina e de palmitoil CoA, através da enzima serina palmitoiltransferase (SPT) (E.C. 2.3.1.50), uma enzima piridoxal 5'fosfato-dependente.

Sabendo-se que a desnutrição altera vários parâmetros no desenvolvimento do sistema nervoso central, este trabalho avaliou os efeitos da hiponutrição protéica pré e pós-natal sobre a síntese dos esfingolipídios, através da medida da atividade da enzima limitante desta rota (SPT) e através da incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina no “esqueleto lipídico” dos esfingolipídios hipotalâmicos.

A atividade específica da SPT foi menor em ratos hiponutridos (dieta contendo 8% de caseína) a partir do sétimo, até o vigésimo-primeiro dia de vida pós-natal (idade na qual registrou-se uma menor atividade), quando comparados com o controle (ratos normonutridos com dieta contendo 25% de caseína).

Conjuntamente, nossos resultados evidenciaram que a hiponutrição protéica pré e pós-natal imposta no período vulnerável do desenvolvimento cerebral, causa uma diminuição da atividade específica da serina palmitoiltransferase, a enzima limitante da síntese *de novo* de esfingolipídios. Decorrente disto, observamos um comprometimento da biossíntese destes compostos, com uma menor incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina nos diferentes esfingolipídios. Assim, estes resultados contribuem no esclarecimento de que a hiponutrição protéica pré e pós-natal provoca uma redução na concentração de gangliosídios hipotalâmicos, previamente reportado por nosso grupo (Trindade et al., 1992), devido a alterações no conteúdo dos precursores biossintéticos dos esfingolipídios, comprometendo bioquimicamente o desenvolvimento do S.N.C.

## LISTA DE FIGURAS

I.1 - Estrutura Geral dos Esfingolipídios.....	9
I.2 - Biossíntese de Esfingolipídios.....	2
I.3 - Metabolismo de Esfingolipídios.....	18
II.1 - Obtenção da Fração Microsomal.....	26
II.2 - Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Esfingolipídios Hipotalâmicos.....	30
III.1 - Efeito do Tempo de Incubação na Atividade da SPT.....	33
III.2 - Efeito da Variação da Quantidade de Proteínas na Atividade da SPT.....	34
III.3 - Atividade da SPT em Função da Concentração de Serina.....	35
III.4 - Atividade da SPT em Função da Concentração de Palmitoil CoA.....	36
III.5 - Identificação do Produto da Atividade da SPT.....	37
III.6 - Efeito do Tempo de Congelamento sobre a Atividade da SPT.....	38
III.7 - Efeito de Detergentes sobre a Atividade da SPT.....	39
III.8 - Efeito da Haletos sobre a Atividade da SPT.....	40
III.9 - Massa Corporal de Ratos Normonutridos e Hiponutridos.....	41
III.10 - Massa Hipotalâmica de Ratos Normonutridos e Hiponutridos.....	42
III.11 - Atividade da SPT em Hipotálamos de Ratos Normonutridos e Hiponutridos, durante o Desenvolvimento.....	43
III.12 - Efeito da Variação do Tempo de Incubação na Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Esfingolipídios Totais.....	44
III.13 - Identificação dos Diferentes Esfingolipídios Obtidos após a Incubação com L-[3- <sup>14</sup> C]serina, Variando-se o Tempo de Incubação.....	45
III.14 - Efeito do Variação do Tempo de Incubação sobre a Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Diferentes Esfingolipídios.....	46
III.15 - Efeito da Variação da Quantidade de Tecido sobre a Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Esfingolipídios Totais.....	47
III.16 - Identificação dos Diferentes Esfingolipídios Obtidos após a Incubação com L-[3- <sup>14</sup> C]serina, Variando-se a Quantidade de Tecido.....	48
III.17 - Efeito da Variação da Quantidade de Tecido na incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Diferentes Esfingolipídios.....	49
II.18 - Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Esfingolipídios Hipotalâmicos de Ratos Normo e Hiponutridos de 21 Dias de Idade.....	50

## LISTA DE TABELAS

II.1 - Composição das Dietas.....	24
III.1 - Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Esfingolipídios Hipotalâmicos de Ratos Normo e Hiponutridos de 21 Dias de Idade Pós-Natal.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

AE: atividade específica  
β-F-alanina: β-fluoro-alanina  
C.C.D.: cromatografia em camada delgada  
CHAPS: 3-colamidopropildimetilamônio-1-propano sulfonato  
CPM: contas por minuto  
DNa: desoxicolato de sódio  
E.C.: número da classificação enzimática  
EP: erro padrão  
FB1: Fumonisina B1  
G: gestacional  
LC: lactosilceramida  
GC: glicosilceramida  
GG: gangliosídios  
NANA: ácido N-acetilneuramínico  
POP: 2,5-difeniloxazol  
POPOP: 1,4-bis[2-(5-feniloxazonil)]benzeno  
P40: nonidet P40  
RE: retículo endoplasmático  
SM: esfingomielina  
S.N.C.: sistema nervoso central  
SPLs: esfingolipídios  
SPT: serina palmitoiltransferase  
T20: tween 20  
T80: tween 80  
TX100: triton X100  
UDPG: uridina difosfatoglicose  
3-KDS: 3-cetoesfinganina

## SUMÁRIO

<b>I - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
I.1 - DESENVOLVIMENTO CEREBRAL E HIPONUTRIÇÃO.....	1
I.1.1 - Crescimento cerebral.....	1
I.1.2 - Período de Rápido Crescimento Cerebral.....	2
I.1.3 - Efeitos da Hiponutrição sobre o Crescimento Cerebral.....	2
I.1.3.1 - Modelos Experimentais para o Estudo da Hiponutrição.....	3
I.1.3.2 - Aspectos Neuroanatômicos, Neuroquímicos, Comportamentais e Bioquímicos.....	4
I.2 - ESFINGOLIPÍDIOS.....	8
I.2.1 - Conceito e Classificação.....	8
I.2.2 - Biossíntese <i>de novo</i> dos Esfingolipídios.....	10
I.2.2.1 - Aspectos Gerais.....	10
I.2.2.2 - Serina palmitoiltransferase.....	11
I.2.3 - Metabolismo dos Esfingolipídios.....	15
I.2.3.1 - "Turnover" dos Esfingolipídios.....	15
I.2.3.2 - Origem e Destino das Bases Esfingóides.....	16
I.2.3.3 - Inibidores do Metabolismo dos Esfingolipídios.....	17
I.2.4 - Papel Fisiológico dos Esfingolipídios.....	19
I.3 - HIPOTÁLAMO.....	20
I.4 - OBJETIVOS.....	21
<b>II - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
II.1 - MATERIAIS.....	22
II.1.1 - Animais.....	22
II.1.2 - Produtos Químicos.....	22
II.2 - MÉTODOS.....	23
II.2.1 - Dietas Oferecidas aos Animais Experimentais.....	23
II.2.2 - Grupos de Animais.....	23
II.2.2.1 - Animais Normonutridos.....	23
II.2.2.2 - Animais Hiponutridos.....	23
II.2.3 - Isolamento de Hipotálamos.....	25
II.2.4 - Determinação da Atividade da SPT.....	25
II.2.4.1 - Obtenção da Fração Hipotalâmica Microsomal.....	25
II.2.4.2 - Sistema de Incubação da SPT.....	25
II.2.4.3 - Processamento após a Incubação.....	26

II.2.4.4 - Identificação do Produto da Reação.....	27
II.2.5 - Caracterização Parcial da Enzima SPT.....	28
II.2.5.1 - Influência do Tempo de Congelamento sobre a Atividade da SPT.....	28
II.2.5.2 - Influência dos Detergentes sobre a Atividade da SPT.....	28
II.2.5.3 - Influência dos Haletos sobre a Atividade da SPT.....	28
II.2.6 - Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Esfingolipídios Hipotalâmicos.....	29
II.2.6.1 - Marcação e Isolamento dos Esfingolipídios.....	29
II.2.6.2 - Identificação e Avaliação Quantitativa dos Esfingolipídios.....	31
II.2.7 - Análise Estatística.....	31
<b>III - RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
III.1 - ATIVIDADE DA SERINA PALMITOILTRANSFERASE.....	32
III.1.1 - Parâmetros Cinéticos da SPT.....	32
III.1.1.1 - Efeito da Variação do Tempo de Incubação sobre a Atividade da SPT.....	33
III.1.1.2 - Efeito da Variação da Quantidade de Proteínas sobre a Atividade da SPT.....	34
III.1.1.3 - Efeito da Variação da Concentração de Serina sobre a Atividade da SPT.....	35
III.1.1.4 - Efeito da Variação da Concentração de Palmitoil CoA sobre a Atividade da SPT.....	36
III.1.2 - Identificação do Produto de Reação da SPT.....	37
III.1.3 - Caracterização Parcial da Enzima SPT.....	38
III.1.3.1 - Efeito do Tempo de Congelamento sobre a Atividade da SPT.....	38
III.1.3.2 - Efeito dos Diversos Detergentes sobre a Atividade da SPT.....	39
III.1.3.3 - Efeito dos Diversos Haletos sobre a Atividade da SPT.....	40
III.1.4 - Efeito da Hiponutrição sobre a Atividade da SPT.....	41
III.1.4.1 - Controle do Modelo de Hiponutrição.....	41
III.1.4.1.1 - Massa Corporal.....	41
III.1.4.1.2 - Massa Hipotalâmica.....	42
III.1.4.2 - Atividade da SPT em Hipotálamos de Ratos Normo e Hiponutridos, durante o Desenvolvimento.....	43
III.2 - Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Esfingolipídios Hipotalâmicos.....	44
III.2.1 - Padronização da Técnica de Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Esfingolipídios.....	44
III.2.1.1 - Efeito da Variação do Tempo de Incubação sobre a Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Esfingolipídios.....	44
III.2.1.2 - Efeito da Variação da Quantidade de Tecido sobre a	



Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Esfingolipídios.....	47
III.2.2 - Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina em Esfingolipídios Hipotalâmicos de Ratos Normo e Hiponutridos aos 21 Dias de Idade.....	49
III.2.2.1 - Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina na Fração Esfingolípídica Total.....	49
III.2.2.2 - Incorporação de L-[3- <sup>14</sup> C]serina nos Diferentes Esfingolipídios .....	49
<b>IV - DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>V - CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>

## **I - INTRODUÇÃO**

### **I.1. DESENVOLVIMENTO CEREBRAL E HIPONUTRIÇÃO**

#### **I.1.1 CRESCIMENTO CEREBRAL**

O crescimento de um órgão, incluindo o cérebro, ocorre por aumento no número de células, aumento no tamanho das células ou por ambos os fenômenos.

Três fases distintas histologicamente caracterizam o desenvolvimento cerebral, segundo Morgane et al., 1978: a) hiperplasia, onde o crescimento do cérebro deve-se unicamente ao aumento no número de células devido à intensa atividade mitótica; b) hiperplasia com concomitante hipertrofia: onde as células dividem-se mais lentamente e o crescimento do órgão ocorre pelo aumento no tamanho das células; c) hipertrofia: quando o crescimento deve-se unicamente ao aumento do volume das células e quando o número de células neurais já foi atingido e permanece por toda a vida.

Entretanto, o cérebro não é um órgão homogêneo e o tempo de duração destas três fases difere nas várias regiões. Estas apresentam diferentes tipos celulares com características específicas de divisão e de possível migração para outros locais do sistema nervoso central (Winick, 1970).

No rato, a hiperplasia neuronal prevalece na vida pré-natal, ocorrendo principalmente durante a última semana de gestação (Dobbing, 1968). Áreas específicas como o bulbo olfatório, cerebelo e o hipocampo ainda apresentam divisão celular até o décimo sétimo dia de vida pós-natal (Morgane et al., 1978).

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). As células gliais apresentam proliferação pós-natal, ocorrendo durante o período de lactação.

A sinaptogênese no cérebro de rato, ocorre principalmente entre o sétimo e vigésimo-primeiro dia de vida pós-natal, podendo diferir de região a região. O aumento nos contatos sinápticos e a diferenciação destas conexões representam o começo do desenvolvimento químico e funcional do sistema nervoso central. A mielinização, no rato, inicia entre dez e quinze dias de idade e alcança um pico de velocidade máxima aos vinte dias, quando declina abruptamente aos níveis adultos (Davidson e Dobbing, 1966).

### I.1.2. PERÍODO DE RÁPIDO CRESCIMENTO CEREBRAL

O “surto de rápido crescimento cerebral” compreende as três primeiras semanas de vida, sendo caracterizado por rápidas mudanças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas no cérebro. Este período inicia quando a multiplicação neuronal termina, onde os corpos neuronais do rato estão praticamente formados. Esta fase de rápido crescimento é devida, principalmente, ao desenvolvimento dos processos neuronais, à elaboração de sinapses, à multiplicação de células gliais e à mielinização.

Com base nisso, Dobbing (1968) formulou a “hipótese do período vulnerável”, no qual o cérebro possuiria uma única oportunidade para crescer. Qualquer fator que prejudicasse este período, como por exemplo, a hiponutrição, afetaria o processo de crescimento do órgão como resultado de um número reduzido de células. No rato, esta fase corresponde às três primeiras semanas de vida (Morgane et al., 1978).

### I.1.3 EFEITOS DA HIPONUTRIÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO CEREBRAL

Mudanças histológicas têm sido observadas no sistema nervoso central de várias espécies animais submetidas a dietas deficientes em proteínas. A severidade destas mudanças está relacionada com o período do desenvolvimento em que a restrição nutricional for imposta e com a duração da deficiência alimentar. Outras evidências indicam que a hiponutrição imposta ao rato no período do pré-desmame, provoca mudanças morfológicas, químicas e funcionais no cérebro (Dobbing and Sands, 1971; Morgane et al., 1978)

O tempo é um elemento crítico nestes estudos. Dados obtidos de trabalhos com animais e humanos revelam claramente que a hiponutrição imposta nas fases iniciais do desenvolvimento tem efeitos mais severos e permanentes (Winick, 1970). As três primeiras semanas de vida do rato correspondem ao período em que há um surto de crescimento cerebral. É um período de desenvolvimento acelerado das várias partes do cérebro; um insulto nutricional neste período tem consequências neurológicas graves. A mesma restrição aplicada antes ou depois, mas não durante o período de rápido crescimento cerebral, tem efeitos menos severos e temporários (Dobbing and Sands, 1971).

O desenvolvimento do sistema nervoso central consiste em uma progressão ordenada de eventos morfológicos, bioquímicos e funcionais que ocorrem em uma sequência ordenada. A hiponutrição é um dos insultos que

afeta o desenvolvimento do cérebro, sob vários aspectos: neuroanatômicos, neuroquímicos, comportamentais e bioquímicos (Morgane et al., 1978).

#### I.1.3.1 - Modelos Experimentais para o Estudos da Hiponutrição

Vários métodos são descritos na literatura para induzir a hiponutrição, durante o período gestacional e/ou lactacional:

- a) redução dos níveis protéicos da dieta oferecida às mães;
- b) diminuição da quantidade de dieta oferecida às mães;
- c) aumento no número de filhotes por ninhada;
- d) mamectomia parcial;
- e) exposição rotativa dos filhotes a fêmeas lactentes e não-lactentes, ou fêmeas lactentes e incubadora;
- f) alimentação intra-gástrica dos filhotes.

A redução do nível de proteína na dieta oferecida às mães, induz a um decréscimo na produção e uma alteração na composição do leite materno (Crnic e Chase, 1978; Sturman et al., 1986; Grimble e Mansaray, 1987). Desta forma, as ratas lactentes desenvolvem desnutrição protéica e os filhotes, hiponutrição proteico-calórica. Os filhotes, após o desmame, passam a receber “ad libitum”, a mesma dieta que foi dada às mães. Os níveis protéicos mais utilizados na literatura correspondem a 8% para dieta hipoprotéica e 25% para a dieta normoprotéica ou controle.

O nosso laboratório há vários anos adotou este modelo de hiponutrição para estudar diferentes parâmetros neurobioquímicos e comportamentais (Perry et al., 1984; 1986; 1990; Perry and Izquierdo, 1989; Azzolin et al., 1991; Trindade et al., 1992; 1993; 1995).

Outra forma de hiponutrição materna visando atingir a prole, consiste na redução, pela metade, da quantidade de dieta oferecida “ad libitum” às fêmeas. Esta forma de hiponutrição provoca uma alteração na quantidade de leite produzido, mas sua composição permanece inalterada (Crnic e Chase, 1978; Rathbun e Druse, 1985).

O aumento no número de filhotes por ninhada, empregada por Winick e Noble (1966) induz a hiponutrição protéico-calórica nos filhotes. Estes autores mantinham 18 filhotes por rata mãe no grupo hiponutrido, enquanto que 9 a 12 filhotes permaneciam com a rata lactente no grupo controle. Após o desmame, o grupo hiponutrido recebia quantidade reduzida de alimento, continuando o processo de hiponutrição. Neste modelo de hiponutrição, não há

homogeneidade entre os pesos corporais da ninhada, avaliada durante todo o período de lactação (Galler e Kanis, 1987).

A mamectomia parcial reduz o número de mamas viáveis disponíveis em relação ao número de filhotes. Quando três pares de mamas alternadas são removidas, o peso dos filhotes é reduzido de dez a vinte por cento no período de lactação, quando comparado com o peso do grupo controle. Caso um número maior de mamas for removido, a mortalidade dos filhotes aumenta. Este modelo só deve ser empregado em casos de hiponutrição branda (Galler e Kanis, 1987; Crnic e Chase, 1978).

Em outro método, os filhotes recém-nascidos são separados da mãe por intervalos de oito a doze horas e colocados junto com uma fêmea virgem (Slob et al., 1973) ou num ambiente climatizado (incubadora) (Rajalakshemi et al., 1967). Estes filhotes têm pesos de quarenta a cinquenta por cento menores que os controles, que permaneceram com a rata lactente por todo o tempo.

Outra técnica para produzir hiponutrição é a que utiliza alimentação intra-gástrica: através de uma sonda intra-gástrica, o filhote é alimentado com o leite da própria mãe ou com uma dieta artificial (Dymsza et al., 1964)

As consequências de cada método são dependentes da duração e do período em que a restrição alimentar é imposta. Efeitos severos ocorrem quando a hiponutrição é aplicada durante a fase crítica e vulnerável do rápido crescimento cerebral, que nos ratos corresponde às três primeiras semanas de vida pós-natal (Dobbing e Sands, 1971; Morgane, 1978).

### I.1.3.2- Aspectos Neuroanatômicos, Neuroquímicos, Comportamentais e Bioquímicos

Várias evidências demonstram que a hiponutrição precoce (imposta desde o período gestacional até a idade lactacional) e severa, afeta tanto a estrutura como a função cerebral. Widdowson e Mc Cance (1960) demonstraram que a desnutrição imposta a ratos desde o nascimento até o desmame (hiponutrição tardia), causa uma diminuição no tamanho do cérebro em relação a ratos controle normonutridos e esta diferença persiste após a realimentação dos mesmos. Ratos hiponutridos após o desmame apresentaram uma diminuição na massa cerebral em relação ao controle e com a realimentação, a massa do cérebro retornou ao normal.

Perry et al. (1986) encontraram diferenças significativas que iniciam aos quinze dias de idade entre os pesos cerebrais de ratos cujas mães foram alimentadas com dieta contendo 8% de caseína (dieta hipoprotéica) após o

nascimento de sua prole, quando comparados ao grupo controle (dieta normoprotéica contendo 25% de caseína).

Trindade et al. (1992) encontraram que o peso hipotalâmico de animais hiponutridos (dieta com 8% de caseína) somente após o nascimento, e o peso hipotalâmico de animais hiponutridos pré e pós-natalmente com uma dieta alimentar similar, foi inferior ao peso hipotalâmico de animais normonutridos (25% de caseína). No grupo controle, o peso dos hipotálamos cresceu entre os sete e dez dias e a partir daí, o incremento foi menor. No grupo hiponutrido pós-natalmente, este aumento ocorreu mais tardiamente: entre o décimo e o décimo-quinto dia. Nos ratos hiponutridos antes e após o nascimento, o peso hipotalâmico não aumentou com a idade e os mesmos ratos apresentaram um peso hipotalâmico mais baixo que os ratos hiponutridos apenas após o nascimento, a partir do décimo-quinto dia de vida.

Robain e Ponsot (1978) mostraram que a hiponutrição protéico-calórica diminui a proliferação glial e retarda a maturação glial no *trato cuneatus* e *corpum callosum*, respectivamente.

Além da massa, o crescimento de um órgão como o cérebro pode ser acompanhado através da relação proteína/DNA, a qual pode estimar o tamanho de suas células constituintes (Winick and Noble, 1966), bem como a quantidade de DNA, que pode refletir o número de células de um órgão (Winick, 1970).

Considerando isso, Winick e Noble (1966) observaram que a hiponutrição precoce em ratos, levava à uma redução permanente no número de células do cérebro (conteúdo de DNA), embora o seu tamanho (relação proteína/DNA) não era afetado. Com a hiponutrição imposta após o desmame, o número de células permanecia inalterado e o tamanho das mesmas, diminuído. Posteriormente, Winick et al. (1968) mostraram que a recuperação nutricional aplicada dos nove aos vinte e um dias de idade, revertia completamente os efeitos da hiponutrição precoce.

Em 1991, Azzolin et al. verificaram que a concentração de DNA é maior em cerebelo de ratos normonutridos (25% de caseína) de sete e quinze dias, do que nos hiponutridos da mesma idade. Porém, aos vinte e um dias, este parâmetro foi maior nos hiponutridos, indicando um atraso na velocidade de divisão celular.

Vários estudos mostram que a hiponutrição durante o período lactacional provoca alterações permanentes nos processos de mielinização: retardo na migração das células gliais (Bass et al., 1970), menor concentração de mielina cerebral (Fueller et al, 1984) e redução na espessura da bainha de mielina (Krigman e Hogman, 1976).

A hiponutrição perinatal pode afetar de modo transitório ou permanente as concentrações de diversos neurotransmissores e moduladores. Os níveis cerebrais de acetilcolina são diminuídos pela hiponutrição, antes e depois do desmame, retornando aos níveis normais após a reabilitação nutricional (Wiggins et al., 1984).

Ratos hiponutridos durante a lactação e reabilitados por uma semana, apresentaram um decréscimo em torno de vinte por cento nos níveis de receptores muscarínicos no hipotálamos e estriado e um pequeno aumento no mesencéfalo (Wiggins et al., 1984).

Os níveis de catecolaminas em ratos hiponutridos, podem diminuir (Shoemaker and Wurtman, 1973), aumentar ou permanecer inalterados (Sobotka et al., 1974). A atividade da enzima tirosina-hidroxilase parece estar aumentada no período de hiponutrição lactacional e reabilitação alimentar (Wiggins et al., 1984). Este mesmo autor demonstrou que a hiponutrição eleva os níveis de serotonina e de seus metabólitos em várias regiões cerebrais.

A hiponutrição durante a lactação causa uma diminuição nos níveis de  $\beta$  endorfina cerebrais em ratos adultos (Perry et al., 1984) e hipossensibilidade comportamental, tanto à antagonistas (Rotta et al., 1988), como à própria  $\beta$  endorfina (Perry and Izquierdo, 1989; Perry et al., 1990).

As variações na ingestão protéica determinam alterações nos níveis plasmáticos de aminoácidos, fato que pode ter consequências a nível de barreira hemato-encefálica e/ou a nível de cérebro. Portanto, pode ocorrer uma mudança na competição pelo transporte de precursores para o interior do cérebro e/ou uma alteração no "pool" de precursores utilizados na síntese de proteínas estruturais, de hormônios peptídicos, de neurotransmissores e de enzimas em geral (Rassin, 1987). Distintas etapas metabólicas podem ser afetadas e em graus diferentes: algumas sendo estimuladas e outras sendo inibidas. Os níveis destas alterações podem depender do estágio de desenvolvimento (Lajtha et al., 1987).

Os níveis de fosforilação de algumas proteínas são alteradas com a hiponutrição. Salbego e Souza (1986) demonstraram que a quantidade de fosforilserina estava reduzida no rato adulto submetido à hiponutrição protéica pós-natal e reabilitado nutricionalmente. Por outro lado, a hiponutrição protéica induziu um aumento na fosforilação de proteínas presentes nos microtúbulos do citoesqueleto do córtex cerebral de ratos. Valente et al. (1992), demonstraram um aumento na incorporação de  $^{32}\text{P}$  em determinadas isoformas de  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas.

Reddy e Sastry (1978) demonstraram que as concentrações de colesterol, fosfolipídios e galactolipídios são menores em animais hiponutridos em relação ao controle. Este efeito não foi observado em ésteres de colesterol

(Yusuf e Mozaffar, 1979). A síntese de lipídios a partir de acetil CoA, derivada de U-[<sup>14</sup>C]-leucina foi a mesma em cerebelo de ratos normo e hiponutridos, durante o período de rápido crescimento cerebral (Azzolin et al., 1991). Resultados semelhantes com glicina, alanina e leucina em hipocampo de ratos normo e hiponutridos foram demonstrados recentemente por Govinatzki et al. (1997).

Trindade et al. (1992), demonstraram que os níveis de gangliosídeos e sialoglicoproteínas hipotalâmicas de ratos hiponutridos posnatalmente, foram menores que em ratos controles de dez dias, enquanto que em ratos hiponutridos antes e após o nascimento esta diferença ocorreu no sétimo dia.

Diferentes enzimas presentes no sistema nervoso central podem ter sua quantidade e/ou suas propriedades alteradas, afetando o metabolismo em geral. Morgan e Winick (1980-a) encontraram menor incorporação de [<sup>14</sup>C]-NANA a proteínas cerebrais e cerebelares de ratos cujas mães foram submetidas à hiponutrição protéica. Tanto no cérebro como no cerebelo, o pico de incorporação de [<sup>14</sup>C]-NANA a proteínas estavam retardados. Morgan e Naismith (1982) evidenciaram uma diminuição na atividade e um retardo no pico da sialidase. No cérebro dos ratos normonutridos, o máximo da atividade da sialidase se dá aos oito dias de vida pós-natal, enquanto que no cérebro dos ratos hiponutridos, o pico de atividade apareceu aos dezesseis dias de vida pós-natal.

Trindade et al. (1993), observaram que a hiponutrição pré-natal altera a atividade das enzimas GD<sub>3</sub> e GM<sub>2</sub> sintases, enzimas da biossíntese de gangliosídeos. Ambas apresentaram atividade enzimática mais elevada em hipotálamos de ratos hiponutridos (dieta contendo 8% de caseína), comparativamente aos ratos controles normonutridos (25% de caseína), aos vinte e um dias de gestação. Em 1995, Trindade et al. demonstraram uma alteração no perfil de gangliosídeos hipotalâmicos em ratos hiponutridos comparados aos normonutridos, de mesma idade.

Pela análise da literatura, pode-se inferir que o sistema nervoso central se adapta aos efeitos da hiponutrição, embora isto não impeça que determinadas alterações ocorram e que suas consequências se manifestem em períodos distintos do desenvolvimento, para as diferentes estruturas cerebrais.



## I.2 - ESFINGOLIPÍDIOS

Esfingolipídios foram primeiramente reportados por Thudichum (1884) como um "grupo enigmático" de novos componentes, os quais foram isolados quando se estudava a composição química do cérebro. Isto explica a denominação de muitos destes componentes (esfingomielina, cerebrosídeos), embora esta nomenclatura obscura o fato de que os esfingolipídios estejam presentes em todas as células eucarióticas e em algumas células procarióticas, frequentemente em quantidades maiores do que as do cérebro (Merrill Jr. et al., 1995).

Esfingolipídios são constituintes de todos os tipos celulares, onde eles ocorrem, principalmente, na membrana plasmática e em organelas celulares cujo funcionamento esteja associado com a membrana plasmática, como o Retículo Endoplasmático, o aparelho de Golgi, os endossomas e os lisossomas. Eles são componentes de lipoproteínas, do leite e de estruturas como as placas ateroscleróticas (Merrill Jr. and Jones, 1990).

### I.2.1 - CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

**Esfingolipídios** são compostos que contém uma longa cadeia alifática aminada (esfingol), uma molécula de ácido graxo, um grupo polar alcoólico e algumas vezes ácido fosfórico em ligação diéster no grupo polar. O esfingol é predominantemente constituído de 18 átomos de carbono com 2 ou 3 grupos hidroxil e uma dupla ligação *trans* na posição 4 (Figura I.1).

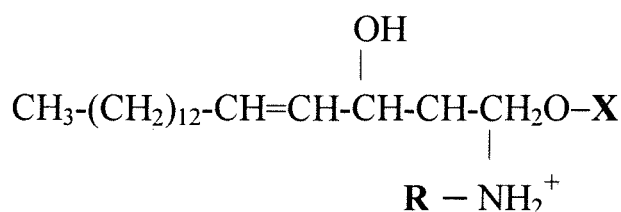
Um esfingolipídio pode consistir somente de um esfingol (esfingosina, dihidroesfingosina ou fitoesfingosina). Mais comumente, a amina é acilada por um ácido graxo ou ácido graxo hidroxilado, formando uma amida. A amida mais simples é chamada ceramida e esta corresponde à unidade estrutural fundamental comum a todos esfingolipídios (Lehninger, 1996).

Há três classes de esfingolipídios, todos derivados da ceramida, mas que diferem nos substituintes da hidroxila primária: esfingomielina, glicolipídios neutros e ácidos (gangliosídeos).

**Esfingomielina** contém fosfocolina como grupo polar. Está presente na membrana plasmática de células animais, principalmente do tecido neural, envolvendo os axônios neuronais.

**Glicoesfingolipídios** são compostos que apresentam o núcleo ceramida acrescido de uma ose. Glicoesfingolipídios que contém um resíduo de açúcar

somente, são denominados cerebrosídeos. Os cerebrosídeos mais comuns, glicosilceramida e galactosilceramida, são formados por reações catalizadas por glicosiltransferases que utilizam uridina difosfatoglicose (UDPglicose) e uridina difosfatogalactose (UDPgalactose) como seus respectivos doadores de oses. Aqueles com galactose, são caracteristicamente encontrados na membrana plasmática de células do tecido neural, e aqueles com glicose, na membrana plasmática de células de tecidos extra-neurais. Gangliosídeos, o mais complexo grupo de esfingolipídios, contém um grupo polar composto de muitas unidades de oses ligadas à uma ou mais unidades de ácido *N*-acetilneuramínico (NANA). Os gangliosídeos representam cerca de 6% dos lipídios de membrana na massa cinzenta do cérebro humano, e estão presentes em menores quantidades na membrana da maioria dos tecidos animais extra-neurais (Lehninger, 1996).



<b>Esfingolipídio</b>	<b>Substituintes da hidroxila primária</b>	<b>R</b>
Esfingosina	- H	- H
Esfingosina-1-fosfato	- PO <sub>3</sub>	- H
Ceramida	- H	Ác. graxo de longa cadeia
Ceramida-1-fosfato	- PO <sub>3</sub>	Ác. graxo de longa cadeia
Glicosilceramida	Glicose	Ác. graxo de longa cadeia
Esfingomielina	Colina-P	Ác. graxo de longa cadeia
Gangliosídeos	Oligossacarídios e resíduos de ác. siálico	Ác. graxo de longa cadeia

### **Figura I.1 - ESTRUTURA GERAL DOS ESFINGOLIPÍDIOS**

O componente comum a todos esfingolipídios é a base esfingóide, mostrado aqui como *D-erythro*-esfingosina. "X" designa o substituinte da hidroxila primária dos esfingolipídios, enquanto o "R" designa o componente graxo (Hannun and Linaudic, 1993).

## I.2.2 - BIOSÍNTESE *DE NOVO* DOS ESFINGOLIPÍDIOS

### I.2.2.1 - Aspectos Gerais

A biossíntese dos esfingolipídios inicia no Retículo Endoplasmático, onde palmitoil CoA e L-serina são combinados para formar 3-cetoesfinganina (3-KDS) e CO<sub>2</sub>, por ação da enzima serina palmitoiltransferase (E.C. 2.3.1.50) (SPT), uma enzima piridoxal 5'-fosfato dependente. Esta parece ser a reação limitante da biossíntese das bases de longas cadeias, devido ao seu produto ser rapidamente reduzido à esfinganina através da 3-cetoesfinganina redutase, uma enzima NADPH-dependente. Esta base de longa cadeia pode ser modificada à esfingosina, ou mais provavelmente, ser convertida à dihidroceramida pela adição de um ácido graxo por ação da esfinganina N-aciltransferase. A dihidroceramida é, então, transformada em ceramida pela introdução de uma ligação dupla no carbono 4, através da dihidroceramida desidrogenase (Mandon et al, 1992; Merrill Jr. and Wang, 1992; Spiegel and Merrill Jr., 1996) (Figura I.2).

Merrill Jr. e Wang (1986), demonstraram que a ligação dupla na posição *trans*-4 é adicionada após a formação de N-acilesfinganina (dihidroceramida). Similarmente, não foram encontradas evidências para a síntese direta de esfingosina a partir de esfinganina, analisando os intermediários marcados e detectados. Rother et al (1992) comprovaram este achado, trabalhando com células B104 de neuroblastoma, na presença dos precursores radioativos N-[1-<sup>14</sup>C]-octanoilesfinganina e D-eritro-[3-<sup>3</sup>H]esfinganina, em presença de Fumonisina B1 (um inibidor da acilação de bases esfingóides).

Ceramida é a base sobre a qual os esfingolipídios mais complexos são formados por adição de um grupo polar na posição 1: (a) fosforilcolina a partir da fosfatidilcolina, através da enzima esfingomielina sintase, formando a esfingomielina, e (b) glicídios para formar glicoesfingolipídios por adição de resíduos de oses e ác. siálico através de transferases (Merrill Jr., 1991; Hannun and Linaudic, 1993). A adição dos grupos polares ocorre nas membranas pré-Golgi e, em alguns casos, na membrana plasmática (Sandhoff and van Echten, 1994).

Embora a presença de bases esfingóides livres em diferentes células e tecidos tenha sido reportada, estas substâncias ocorrem em pequenas quantidades, representando os intermediários do metabolismo de esfingolipídios (Spiegel and Merrill Jr., 1996).

O sítio intracelular da síntese de esfingomielina foi estudado em frações subcelulares de fígado de rato utilizando *D-erythro*-esfingosina marcada

radioativamente, onde se demonstrou que a síntese deste composto ocorre, predominantemente, nas cisternas *cis* e *medial* do Golgi ( Futerman et al, 1990).

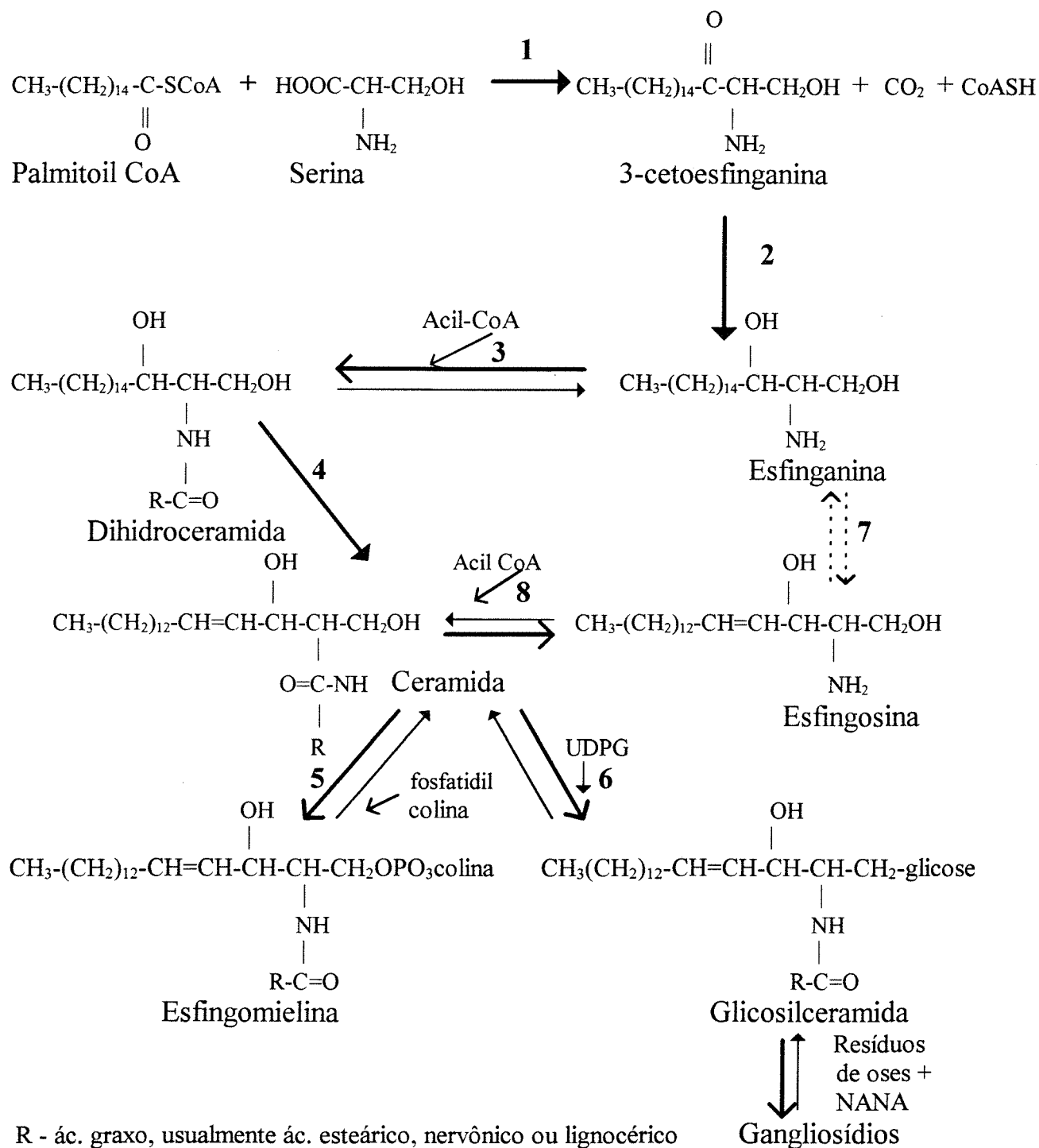
A formação de glicoesfingolípídios envolve a glicosilação da ceramida nas cisternas de Golgi. As enzimas que catalizam os dois primeiros passos da glicosilação (glicosiltransferase e galactosiltransferase I) estão acessíveis do lado citosólico do Golgi (van Echten and Sandhoff, 1989). A adição sequencial de monossacarídeos e resíduos de ácido siálico provoca o crescimento da cadeia oligossacarídica produzindo, inicialmente, gangliosídios simples, e posteriormente, os mais complexos (Sandhoff and van Echten, 1994). Informações sobre a localização das glicosiltransferases no interior do Golgi são derivadas de estudos metabólicos em culturas de células que utilizam inibidores de transporte. Um estudo com cultura de neurônios na presença de Brefeldin A sugeriu que os gangliosídios  $G_{M3}$  e  $G_{D3}$  sejam sintetizados em compartimentos pré-Golgi, enquanto os gangliosídios mais complexos sejam formados no Golgi mais tardio, ou sempre no *trans*-Golgi, onde o Brefeldin A induz o bloqueio (Riboni et al., 1994). Utilizando células de retina de ovos embrionados de pinto, Fritz e Maccioni (1995), confirmaram este estudo.

Portanto, a biossíntese *de novo* de esfingolípídios ocorre, inicialmente, no Retículo Endoplasmático, seguindo as moléculas em crescimento através das cisternas do aparelho de Golgi, e posteriormente, para a membrana plasmática, através de mecanismos de transporte (vesículas) ainda não bem definidos.

#### I.2.2.2 - Serina Palmitoiltransferase (E.C.2.3.1.50)

A serina palmitoiltransferase é a enzima que cataliza a primeira reação na síntese dos esfingolípídios, condensando serina e palmitoil CoA e formando 3-cetoesfinganina (3-KDS). Esta etapa é considerada limitante da biossíntese dos esfingolípídios.

A SPT foi inicialmente caracterizada em preparações utilizando o fungo *Hansenula ciferri* (Braun and Snell, 1968) e cérebro de camundongos (Braun et al., 1970) onde se demonstrou: que serina e palmitoil CoA eram substratos da reação, que a 3-KDS era o produto imediato e que piridoxal 5'-fosfato era requerido para a atividade enzimática. A SPT parcialmente purificada a partir da bactéria *Bacterioides menalinogenicus* apresentou propriedades químicas similares (Lev and Milford, 1981).



**Figura I.2:** BISSÍNTESE DOS ESFINGOLIPÍDIOS ( Adaptado de Shayman, 1996; e Merrill Jr and Jones, 1989).

Estudando a biossíntese *de novo* de esfinganina e esfingosina em células LM incubadas com [<sup>14</sup>C]serina, Merrill Jr. e Wang (1986), observaram que as bases esfingóides livres não foram detectadas (embora a formação de 3-KDS possa ser demonstrada *in vitro*). Assim, as propriedades cinéticas e a rápida formação de dihidroceramida e ceramida sem acumulação de intermediários detectáveis, sugerem que o primeiro passo da biossíntese de esfingolípídios seja a reação limitante desta via.

Williams et al (1984) mostraram que a atividade da SPT reside na fração microssomal, a qual representa a mistura das vesículas derivadas de RE liso e rugoso e também das cisternas de Golgi.

Vários trabalhos estudaram a localização subcelular da SPT. Holleran et al. (1990), trabalhando com cultura de queratinócitos humanos demonstraram que 79% da atividade celular da SPT esteve associada com a fração microssomal. A SPT foi também estudada em plantas, e teve a sua localização confirmada nesta fração (Lynch e Farifield, 1993). Em fígado de ratos, a SPT foi encontrada em todas as frações estudadas e, através da análise dos resultados, comparados com os obtidos de enzimas marcadoras das diferentes frações, 77% da atividade da SPT foi detectada na fração microssomal (Williams et al., 1984).

Em trabalho realizado em 1992, Mandon et al., usando preparações de Golgi e Retículo Endoplasmático altamente purificados de fígado de camundongo, confirmaram a localização da SPT no Retículo Endoplasmático. Esta enzima de atividade biossintética, não é latente, indicando que ela se apresenta no lado citosólico do RE, possibilitando livre acesso do substrato ao sítio ativo. Isto foi demonstrado, tratando-se as vesículas intactas do RE enriquecidas em atividade enzimática da SPT com proteases suaves de diferentes especificidades. A atividade da SPT foi reduzida em 50-80% e não houve diminuição da atividade da manose-6-fosfatase (proteína do lúmen do RE). Esta considerável perda da atividade enzimática sugere que a SPT continha resíduos de aminoácidos importantes, expostos na superfície citosólica das vesículas do RE.

A SPT foi recentemente sequenciada, usando *Saccharomyces cerevisiae* deficiente em esfingolípídios. Nagiec et al. (1994), demonstraram que a superprodução de esfingolípídios neste fungo requeria a expressão de *LCB1*, um gene previamente isolado do fungo, e de *LCB2*, um gene demonstrado neste trabalho e também necessário à atividade da SPT, sugerindo que ambos os genes codificavam subunidades desta enzima e que o aumento na atividade da SPT era obtido somente se ambos os genes *LCB* fossem expressos. Outras evidências bioquímicas ainda serão necessárias para demonstrar esta hipótese.

Vários trabalhos (Williams et al, 1984; Merrill et al., 1985; Mandon et al., 1991) caracterizaram a atividade da serina palmitoiltransferase em preparações de vários tecidos de mamíferos e linhagem de células em cultura (cultura de neurônios cerebelares de ratos). Nestes estudos foi observado que a atividade da enzima refletiu o conteúdo de esfingolipídios dos tecidos. Consistente com isto, Holleran et al. (1990), evidenciaram altos níveis de atividade enzimática da SPT em microssomas derivados de queratinócitos humanos, correspondendo ao elevado conteúdo de esfingolipídios no extrato córneo dos mamíferos.

Merrill Jr. et al. (1985) trabalharam com microssomas derivados de diferentes tecidos de ratos (fígado, pulmão, cérebro, rim, intestino, baço, músculo, coração, testículos, ovários e estômago), no intuito de verificar se os diferentes tecidos eram capazes de iniciar a via metabólica dos esfingolipídios. Serina palmitoiltransferase foi encontrada em todos os tecidos e, a atividade esteve relacionada diretamente com os níveis de esfingomiélinea.

Williams et al. (1984), Williams et al. (1986), Holleran et al. (1990) analisaram a necessidade de alguns componentes do sistema de incubação para a máxima atividade da SPT e verificaram que a ausência de piridoxal fosfato causou um decréscimo de 7 - 30% na atividade enzimática, a ausência de palmitoil CoA, um decréscimo de 93 - 100% e a ausência de ditiotreitól, 29 - 50%. A ausência de EDTA 2,5 mM elevou em 108% a incorporação de serina e este aumento foi atribuído a não inibição da incorporação de serina em fosfatidilserina. A ausência de HEPES não alterou a atividade da enzima trabalhando-se com microssomas da aorta de coelhos (Williams et al., 1986) e diminuiu em 27%, trabalhando com fígado de ratos (Williams et al., 1984). A atividade da SPT foi também caracterizada como dependente da adição de ditiotreitól, já que a mesma mostrou-se diminuída em 29 - 50% na ausência deste componente; já a ausência de esfinganina como "carrier" decresceu o reconhecimento do produto em 16%.

A atividade da SPT foi determinada em diversos sistemas (tecidos animais, vegetais e microorganismos) utilizando-se diferentes ácidos graxos. A atividade enzimática foi consistentemente mais elevada com ácidos graxos saturados de  $16 \pm 2$  átomos de carbono. Isto sugere que a predominância de bases de longas cadeias de 18 átomos de carbono *in vivo* é devida à maior atividade desta enzima com palmitoil CoA (Williams et al., 1984; Merrill Jr. et al., 1985; Holleran et al., 1990; Lynch and Fairfield, 1993).

Analisando a síntese de bases esfingóides de longas cadeias em plantas, Lynch and Fairfield (1993), sugerem que as propriedades e a ação catalítica da SPT sejam similares àsquelas presentes em animais, fungos e bactérias. As semelhanças são quanto: a localização intracelular, pH ótimo, componentes do

sistema enzimático e temperatura de incubação. Porém, a atividade específica da enzima apresentou valores de 2 a 20 vezes mais elevados que aqueles reportados para preparações obtidas a partir de tecidos animais.

A SPT foi, também, caracterizada em microssomas de fígado de ratos e se verificou que mais de 75% da atividade da enzima está associada com a subfração microssomal, com atividade enzimática dependente do tempo de incubação, do pH, de temperatura e de outros componentes do sistema de incubação: concentração de proteínas microssomais, substratos, ditioneitol, EDTA e piridoxal 5'-fosfato (Williams et al., 1984).

Trabalhando com cultura de neurônios cerebelares, Mandon et al. (1991), observaram que a adição de homólogos exógenos da esfingosina com cadeias básicas de diferentes comprimentos (12 e 18 átomos de carbonos) ao meio de cultivo, resultou em um decréscimo da atividade da SPT, proporcional ao tempo de incubação e à concentração adicionada. A atividade da SPT foi rapidamente reversível após a remoção das bases de longas cadeias do meio de cultura. As atividades das outras enzimas envolvidas com o metabolismo de esfingolipídios (ceramida sintase, acil-CoA sintase e colina fosfotransferase) não foram afetadas pela adição de bases esfingóides, indicando que a “down-regulation” da SPT era completamente específica. Estes resultados forneceram fortes evidências de que as bases de longas cadeias regulam sua própria biossíntese em células neuronais. Este efeito pode ser mediado por uma via específica, embora ainda não definida, envolvendo uma modificação covalente da SPT ou mais provavelmente, um repressão da sua biossíntese a nível transcricional.

### I.2.3 - METABOLISMO DE ESFINGOLIPÍDIOS

Bases de longas cadeias (bases esfingóides) são intermediários bioativos tanto da síntese como da degradação de esfingolipídios. Porém, pequeno é o conhecimento de como as quantidades destes compostos são reguladas.

#### I.2.3.1 - “Turnover” de Esfingolipídios

O “turnover” dos esfingolipídios envolve a remoção dos resíduos de bases por glicosidases, e a remoção de fosforilcolina a partir da esfingomielina por, no mínimo, três esfingomielinases distintas (Merril and Jones, 1990). Ceramidase cataliza a clivagem da ligação amida da ceramida, liberando o



ácido graxo e a esfingosina, o “esqueleto lipídico” da maioria dos esfingolipídios. A esfingosina pode, então, ser convertida novamente à ceramida por reacilação, ou ser metabolizada via esfingosina quinase, à esfingosina 1-fosfato, seguida por clivagem à etanolamina fosfato e *trans*-2-hexadecanal por uma liase piridoxal fosfato-dependente. Outra via potencial do metabolismo da esfingosina envolve a metilação, formando di e trimetilesfingosina (Spiegel and Milstien, 1995; Spiegel and Merrill Jr., 1996) (Figura I.3).

### I.2.3.2 - Origem e Destino das Bases Esfingóides

Smith e Merrill Jr. (1995), trabalhando com cultura de células J774A1 (uma linhagem de células macrofágicas), observaram que ocorre um aumento transitório de 10 vezes na quantidade de bases de longas cadeias, quando as células em cultura eram mudadas para um novo meio. Este estudo trouxe importantes elucidações a respeito do metabolismo de esfingolipídios: (1) não houve aumento da incorporação de [<sup>3</sup>H]serina e [<sup>3</sup>H]palmitato em esfingosina; (2) a incorporação de [<sup>3</sup>H]serina foi equivalente ao aumento da quantidade de esfinganina; (3) β-F-alanina, um inibidor da serina palmitoiltransferase, bloqueou a “burst” (aumento rápido) de esfinganina; (4) a magnitude do “burst” dependeu da concentração de serina no meio de cultura, a qual é conhecida por afetar a biossíntese das bases de longas cadeias, e, (5) o aparecimento de esfinganina foi pouco afetado por agentes lisoosmotróficos (cloreto de amônio e cloroquina) que bloqueiam a hidrólise de esfingolipídios nestas células. Em contraste (6), o “burst” de esfingosina aumentou, principalmente, a partir do turnover de esfingolipídios complexos, pois não houve incorporação de [<sup>3</sup>H]serina ou [<sup>3</sup>H]palmitato em esfingosina; (7) a quantidade de esfingosina não foi afetada por β-F-alanina ou pela concentração de serina; (8) o “burst” poderia ser seguido pela liberação de esfingosina e ceramida a partir de esfingolipídios complexos (especialmente esfingomielina) em um processo que foi inibido por cloreto de amônio e cloroquina. Adicionalmente (9), o destino destas bases de longas cadeias diferiram: esfinganina foi preferencialmente (80-85%) acilada e incorporada em dihidroceramida e esfingolipídios complexos, enquanto a maior parte da esfingosina (70%) foi fosforilada e degradada, com incorporação da etanolamina-fosfato resultante, em fosfatidiletanolamina. A esfinganina, entretanto, poderia ser divergida em direção à degradação por adição de um inibidor da *N*-acilação (fumonisina B<sub>1</sub>) (Figura I.3).

Portanto, no estudo detalhado acima, foi estabelecido que a esfinganina livre formada no “burst” aumentou a partir da biossíntese *de novo* de esfingolipídios, enquanto que a esfingosina era derivada do catabolismo de esfingolipídios. O destino das bases de longas cadeias diferiram: embora ambas possam ser convertidas a compostos 1-fosfatados, esfinganina era principalmente acilada, enquanto que a esfingosina era degradada por células J774A1. Este estudo é o primeiro a identificar conclusivamente as origens e os destinos destes compostos endógenos em células intactas.

O metabolismo dos esfingolipídios tem algumas características de um ciclo que é considerado essencial à produção de mensageiros intracelulares. Os intermediários do “turnover” de esfingolipídios podem funcionar regulando muitos processos celulares, tais como: ação de hormônios e de citocinas, fatores de crescimento e de diferenciação (Smith and Merrill Jr., 1995).

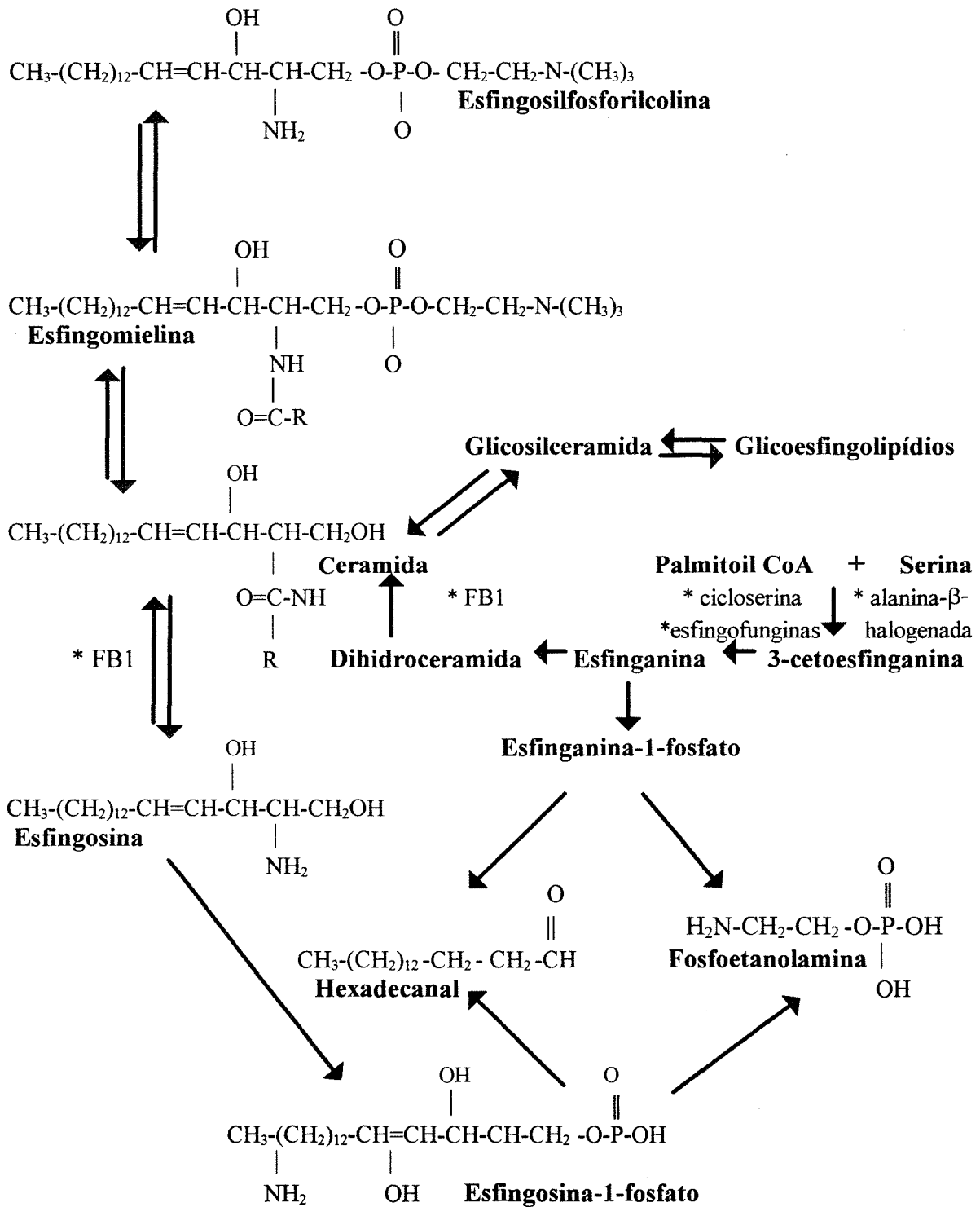
### 1.2.3.3 - Inibidores do Metabolismo de Esfingolipídios

Muitos inibidores sintéticos e naturais do metabolismo de esfingolipídios têm sido descritos e muitos aspectos da sinalização celular baseada em esfingolipídios tem sido estudados.

A enzima serina palmitoiltransferase pode ser bloqueada por cicloserina e por alanina  $\beta$ -halogenada. Sudaram e Lev (1984), mostraram que D e L-cicloserina eram inibidores irreversíveis da SPT, usando enzimas microsomais bacterianas e cerebrais. L-cicloserina foi 100 vezes mais inibitória que o D-isômero para a enzima cerebral *in vitro*. *In vivo*, L-cicloserina causou 70% de inibição da enzima microsomal do cérebro.

Os efeitos da  $\beta$ -cloroalanina na atividade da SPT e na biossíntese *de novo* da esfinganina foram investigados *in vitro* com microsomas de fígado de ratos e *in vivo* com células ovarianas de hamster. A inibição *in vitro* foi rápida, irreversível, concentração e tempo-dependente, e aparentemente envolveu o sítio ativo. Estas são características de um mecanismo de ação baseado em um tipo “suicida” de inibição enzimática (Medlock and Merrill Jr., 1988).

Em 1992, Zweerink et al., examinando o mecanismo de ação de dois produtos naturais identificados como agentes antifúngicos: esfingofunginas B e C, encontraram que eles eram potentes inibidores da SPT em concentrações nanomolares, utilizando para isso, preparações de membrana de *Sacharomyces cerevisiae*.



**Figura I.3 - METABOLISMO DE ESFINGOLIPÍDIOS** (Adaptado de Spiegel and Milstien, 1995; Smith and Merrill Jr., 1995).

A formação de ceramidas, resultantes da acilação da esfinganina ou da esfingosina é inibida por fumonisinas, micotoxinas presentes no milho e em outros grãos, e que possuem uma estrutura química similar às bases esfingóides de longas cadeias (van Echten et al., 1990). A Fumonisina B<sub>1</sub> elevou a quantidade de esfinganina, sugerindo que a fumonisina inibe a conversão de [<sup>14</sup>C]esfinganina em *N*-acil-[<sup>14</sup>C]esfinganina (dihidroceramida). A Fumonisina B<sub>1</sub> inibiu também a atividade da ceramida sintase em microsomas de fígado de rato com 50% de inibição a, aproximadamente, 0,1 μM ou seja, reduziu a conversão de [<sup>3</sup>H]esfingosina para [<sup>3</sup>H]ceramida em hepatócitos intactos (Wang et al., 1991). Zacharias et al. (1996), observaram o efeito da Fumonisina B<sub>1</sub> no desenvolvimento de embriões de pinto, avaliando o efeito deste composto no perfil dos esfingolipídios: inibição da síntese de ceramida com consequente acúmulo de esfingosina.

A degradação de cerebrosídeos, catalizada por β-glicosidase é inibida por hexose e por conduritol B epóxido. A síntese de glicosilceramida pode ser bloqueada por um análogo da ceramida, o PDMP (1-fenil, 2-decanoilamino, 3-morfolinopropanol) (Shayman, 1996).

#### I.2.4 - PAPEL FISIOLÓGICO DOS ESFINGOLIPÍDIOS

Os esfingolipídios são uma família de lipídios amplamente distribuídos na membrana celular. Estes compostos têm o seu papel fisiológico relacionado com a regulação do crescimento, da diferenciação, da transformação e da interação celular. Os esfingolipídios ainda participam da oncogênese, da transdução de sinais e atuam como constituintes de receptores para vírus, bactérias e imunoglobulinas (Hakomori, 1981; Hakomori, 1990; Merrill Jr., 1991; Hannun and Linares, 1993).

Mais recentemente, se tem evidenciado que a atividade biológica dos esfingolipídios não reside somente nos componentes mais complexos (esfingomielina, gangliosídeos e cerebrosídeos), mas também em seus intermediários metabólicos (ceramida, esfingosina, esfingosina-1-fosfato, esfingosina-metilada, liso esfingomielina), os quais são compostos bioativos que atuam como segundo-mensageiros lipídicos (Hannun, 1994; Spiegel and Miltien, 1995). Estas substâncias são encontradas desempenhando um papel na inibição e/ou ativação do crescimento, na indução da diferenciação, na transdução de sinais e na morte celular programada, através de mecanismos que envolvem a regulação de quinases e fosfatases celulares, a ativação de fosfolipases, a alteração dos níveis de cálcio intracelular e a transcrição gênica (Merrill Jr. and Stevens, 1989; Ghosh et al., 1994; Obeid and Hannun, 1995; Shaymann, 1996).

### I.3 - HIPOTÁLAMO

O hipotálamo é uma porção especializada do S.N.C., presente na base do cérebro, acima e atrás do quiasma óptico. As células nervosas deste órgão secretam hormônios, denominados transdutores neuroendócrinos que permitem a transformação de impulsos neuronais em sinais hormonais, recebendo os impulsos oriundos de diversas partes do S.N.C. e atuando sobre a neuro e adeno-hipófises (Smith et al., 1983).

O hipotálamo e a hipófise constituem uma unidade funcional neuroendócrina que regula diversas atividades fisiológicas, como: crescimento, reprodução, lactação, equilíbrio hídrico e comportamento emocional, assim como as funções da supra-renais e da tireóide (Smith et al., 1983)

A neurogênese do hipotálamos, referenciada em diversos trabalhos, demonstram que esta ocorre nos vários núcleos que o constituem, em diferentes períodos, mesmo após o nascimento, durante o período de rápido crescimento cerebral (embora a maioria das mitoses ocorra em neuroglias) (Altman and Bayer, 1978a-b; Anderson, 1978; Seress, 1985).

Perry et al. (1984, 1990), Perry and Izquierdo (1989), Vendite et al. (1985, 1988) demonstraram a participação do hipotálamo nos processos de aprendizado, memória e comportamento, os quais podem estar alterados com a desnutrição protéica. Trindade et al. (1992, 1993, 1995) avaliaram os efeitos da desnutrição protéica sobre o conteúdo, síntese e o perfil dos gangliosídeos hipotalâmicos, com o intuito de estudar bioquimicamente as alterações observadas no SNC em desenvolvimento.

#### **I.4 - OBJETIVOS:**

Considerando que a menor concentração de um tipo de esfingolipídios (gangliosídios), encontrada previamente em hipotálamos de ratos hiponutridos pré e pós-natalmente (Trindade et al., 1992), possa estar relacionada com alguma alteração na biossíntese de seus precursores, decidimos:

**1** - avaliar a atividade da enzima serina palmitoiltransferase em hipotálamos de ratos normo e hiponutridos, pois a ação desta enzima é limitante na rota de síntese dos esfingolipídios. Para isto, foi importante:

a) inicialmente, determinar as condições adequadas da medida da atividade da enzima serina palmitoiltransferase em hipotálamos de ratos;

b) paralelamente, caracterizar de forma parcial a enzima em análise, avaliando: efeito do tempo de congelamento, a ação de detergentes e os efeitos de haletos sobre a atividade enzimática da SPT.

**2** - verificar o efeito da hiponutrição pré e pós-natal sobre a síntese de glicosilceramida, lactosilceramida, gangliosídios e esfingomielina através da incorporação de serina radioativa no seu “esqueleto lipídico”.

## **II - MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **II.1. MATERIAIS:**

#### **II.1.1. ANIMAIS:**

Ratos Wistar provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **II.1.2. PRODUTOS QUÍMICOS:**

- L-[3-<sup>14</sup>C]serina, atividade específica de 53,0 mCi/mmol (AMERSHAM Life Science)

- albumina sérica bovina (SIGMA Chemical Company)

- amido de milho (MAIZENA<sup>R</sup>) (Refinações de milho do Brasil Ltda)

- amônia (MERCK)

- caseína láctica (ALQUÍMICA Distribuidora de Produtos Farmacêuticos Ltda)

- cloreto de cálcio (REAGEN Quimiobrás Indústrias Químicas SA)

- cloreto de sódio (MERCK)

- clorofórmio (MERCK)

- colunas SEP PACK<sup>R</sup> C<sub>18</sub> (Waters Associates, Massachusetts).

- cromatofolhas para C.C.D./ silicagel 60 (MERCK)

- desoxicolato de sódio (RIEDEL-DE HAËNAG)

- ditiotreitol (SIGMA Chemical Company)

- DL-erythrodiidroesfingosina (SIGMA Chemical Company)

- DL-metionina (MERCK)

- EDTA (SIGMA Chemical Company)

- filmes de raio-X X-OMAT<sup>TM</sup> (KODAK)

- fluoreto de sódio (MERCK)

- Folin-Ciocalteu (MERCK)

- fosfatidil serina (SIGMA Chemical Company)

- HEPES (SIGMA Chemical Company)

- iodeto de potássio (MERCK)

- iodo metálico (MERCK)

- metanol (MERCK)

- microcel-celulose microfina (BLANVER Farmoquímica Ltda)

- mistura vitamínica (Roche do Brasil)

- óleo de soja (Santista Alimentos - S.A.)

- óxido de octilfenoletileno (Nonidet P40) (SIGMA Chemical Company)

- palmitoil CoA (SIGMA Chemical Company)

- piridoxal fosfato (SIGMA Chemical Company)
  - polioxidoetileno sorbitol monolaurato (Tween 20) (MERCK)
  - polioxidoetileno sorbitol monoleato (Tween 80) (MERCK)
  - POP e POPOP (SIGMA Chemical Company)
  - sais utilizados para o preparo da mistura salina, segundo a A.O.A.C.<sup>1</sup> (REAGEN Quimiobrás Indústrias Químicas S.A.)
  - sacarose (SIGMA Chemical Company)
  - serina (SIGMA Chemical Company)
  - tolueno (MERCK)
  - triton CF54 (SIGMA Chemical Company)
  - triton X100 (SARDI)
- Todos os reagentes e solventes empregados foram de qualidade “pró-análise”.

## II.2. MÉTODOS:

### II.2.1. DIETAS OFERECIDAS AOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS:

Conforme descrito por Perry et al. (1986); Azzolin et al. (1991), foram oferecidas dietas isocalóricas (440 kcal) contendo 25% (normoprotéica) e 8% (hipoprotéica) de caseína aos animais, “ad libitum”, a fim de se obter, respectivamente, o grupo controle e o grupo hiponutrido.

As dietas foram preparadas pelo nosso grupo de estudos e contiveram quantidades de vitaminas e sais minerais conforme recomendado pela A.O.A.C.<sup>1</sup> (Horwitz, 1980) (Tabela II.1).

### II.2.2. GRUPOS DE ANIMAIS:

II.2.2.1 - Animais Normonutridos (controles): receberam dieta contendo 25% de caseína durante o acasalamento, gestação e lactação.

II.2.2.2 - Animais Hiponutridos: receberam dieta contendo 8% de caseína, nos períodos de acasalamento, gestação e lactação

Para os experimentos com ratos fetais (20,5 dias de gestação), os progenitores foram acasalados por uma noite.

Para os experimentos com ratos de 7, 14 e 21 dias de idade, os ratos foram acasalados por 10 dias consecutivos. As ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes por mãe, no primeiro dia após o nascimento.

O peso corporal dos animais foi determinado antes do sacrifício, aos 2, 4, 7, 14 e 21 dias de idade.

<sup>1</sup> Association of Official Analytical Chemists



**Tabela II.1 - COMPOSIÇÃO DAS DIETAS (g/100g de dieta)**

Componentes	25%	8%
proteínas <sup>1</sup> (caseína)	29,9	9,5
fibras	1,0	1,0
mistura de sais <sup>2</sup>	4,0	4,0
vitaminas <sup>3</sup>	1,0	1,0
óleo de soja	15,0	15,0
DL-metionina	0,3	0,3
amido de milho	49,8	69,2

1 - 83,7% de pureza.

2 - Mistura de sais: mg/100g de ração (de acordo com A.O.A.C. ; Horwitz, 1980)

NaCl.....	557,00
KI.....	3,20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1556,00
MgSO <sub>4</sub> .....	229,00
CaCO <sub>3</sub> .....	1526,00
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	108,00
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	16,00
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	2,20
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	1,90
CoCl.6H <sub>2</sub> O.....	0,09

3 - Mistura vitamínica: mg ou UI/100g de ração (de acordo com A.O.A.C.; Horwitz, 1980)

vitamina A .....	2000	UI
vitamina D .....	2000	UI
vitamina E.....	10	UI
menadiona.....	0,50	mg
colina.....	200,00	mg
ác. p-amino-benzóico.....	10,00	mg
inositol.....	10,00	mg
niacina.....	4,00	mg
Ca-D-pantotenato.....	4,00	mg
riboflavina.....	0,80	mg
tiamina.....	0,50	mg
piridoxina.HCl.....	0,50	mg
ác. fólico.....	0,20	mg
biotina.....	0,04	mg
vitamina B12.....	0,003	mg

### II.2.3 - ISOLAMENTO DOS HIPOTÁLAMOS:

Os animais foram sacrificados por decapitação e rapidamente os cérebros foram removidos e colocados em placas de Petry a 0°C. Os hipotálamos foram isolados e pesados imediatamente.

### II.2.4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SERINA PALMITOILTRANSFERASE (E.C. 2.3.1.50)

#### II.2.4.1 - Obtenção da Fração Hipotalâmica Microssomal

Após a dissecação e pesagem dos hipotálamos, o material foi homogeneizado (aproximadamente 160 mg, correspondente a 8 hipotálamos de uma ninhada) em homogeneizador Potter-Elvehjem (3“strokes”) com solução A (HEPES 50 mM, EDTA 5 mM e sacarose 0,32 M) (1:5 massa/volume) (Figura II.1).

A fração microssomal foi obtida através de ultracentrifugação diferencial, de acordo com Mandon et al. (1991). Primeiramente, procedeu-se a centrifugação de 10.000g/15 minutos/4°C em centrífuga Sorval RC 5B plus (rotor SS-34), para a remoção de núcleos, fragmentos de células e mitocôndrias. Após, o sobrenadante foi submetido à ultracentrifugação a 105.000g/1 hora/4°C, em ultracentrífuga de mesa Beckman TLX (rotor: SN 694). O sedimento obtido foi lavado com solução B (HEPES 50 mM e EDTA 5 mM) e recentrifugado a 105.000g/1 hora/4°C. A fração microssomal então obtida foi suspensa com solução C (HEPES 50 mM, EDTA 5 mM e ditiotreitól 5 mM) aproximadamente 1 µl/mg de tecido original.

Procedeu-se à dosagem de proteínas da fração microssomal hipotalâmica, através do método de Lowry et al. (1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

#### II.2.4.2. - Sistema de Incubação da Serina Palmitoiltransferase (E.C. 2.3.1.50)

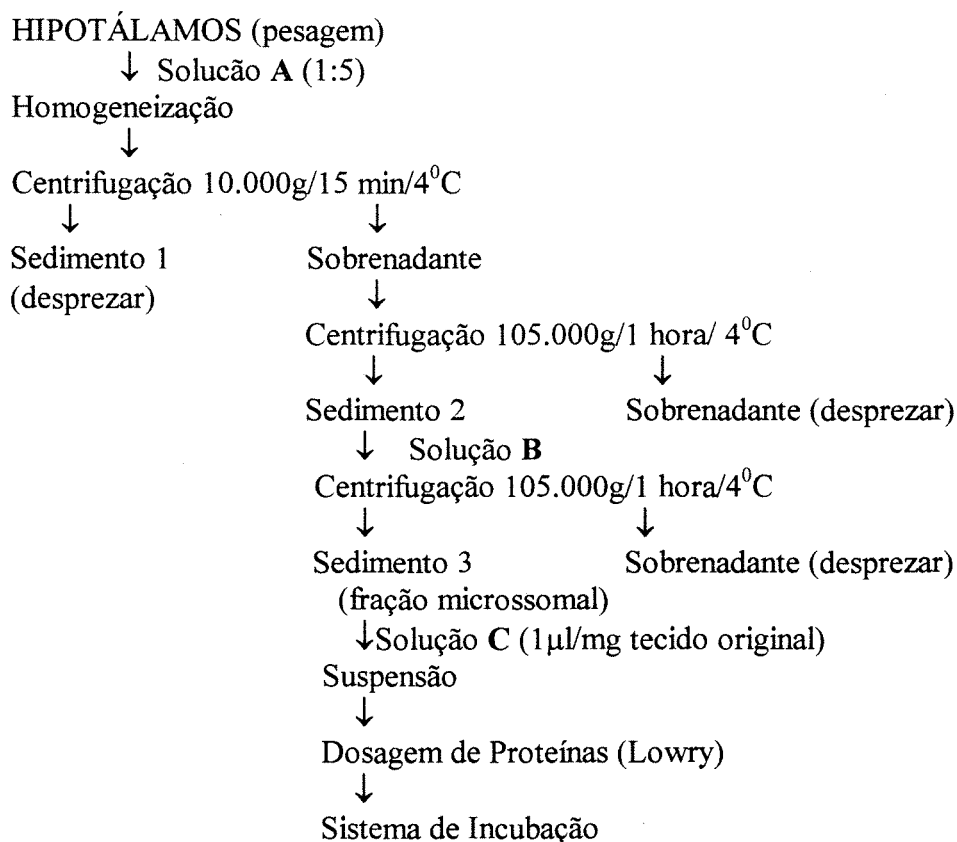
A atividade enzimática foi determinada pela medida da incorporação de serina radioativa L-[3 -<sup>14</sup>C], em 3-cetoesfinganina (3-KDS), segundo Merrill and Wang (1992).

Cada tubo de reação continha HEPES 0,1M (pH 7,4), ditiotreitól 5mM, EDTA 2,5mM, piridoxal fosfato 50µM, palmitoil CoA, serina, L-[3-

$^{14}\text{C}$ ]serina (atividade específica de 10 mCi/mmol) e proteínas microsossomais (fonte enzimática), para um volume final de 50 $\mu\text{l}$  do sistema de incubação. As quantidades de proteínas, de serina e de palmitoil CoA ficaram definidas de acordo com as Figuras III .2, .3, .4, respectivamente.

A reação foi iniciada pela adição de palmitoil CoA e o sistema incubado por tempo determinado (Figura III.1 ) a 37 $^{\circ}\text{C}$ , sob agitação constante.

Tubos-controle da reação foram utilizados, os quais continham todos os componentes do sistema, exceto palmitoil CoA, a fim de se descontar a incorporação radioativa relativa ao substrato endógeno.



**Figura II.1 : OBTENÇÃO DA FRAÇÃO MICROSSOMAL**

#### II.2.4.3 - Processamento após a Incubação

Para interromper a reação, adicionou-se 750  $\mu\text{l}$  de clorofórmio-metanol (1:2,v/v). Para melhorar a extração dos produtos, acrescentou-se 12,5 $\mu\text{g}$  de esfinganina dissolvida em 50  $\mu\text{l}$  de uma solução de clorofórmio:metanol

(1:2,v/v) contendo. Seguiu-se a adição de 500 µl de clorofórmio e 1 ml de NH<sub>4</sub>OH 0,5N ao sistema.

Os tubos de reação foram levemente misturados, centrifugados e obteve-se assim, a separação entre as fases aquosa e orgânica. A fase inferior (orgânica) foi lavada duas vezes com 1 ml de água destilada e a fase inferior resultante, transferida para “vials” de cintilação. O solvente foi evaporado, um volume de 3 ml de líquido de cintilação (POP/POPOP/tolueno 4g:5mg:1000ml) foram adicionados e as amostras posteriormente contadas em aparelhos de cintilação líquida (WALLAC 1409), por 2 minutos.

#### II.2.4.4 - Identificação do Produto da Reação

A fim de se obter uma quantidade de radioatividade suficiente para impressionar um filme de raio-X, utilizou-se o sistema de incubação com o dobro do volume. O término da reação e a extração do produto de reação, também foram realizados com o dobro do volume de solventes.

Realizou-se a separação cromatográfica em uma mistura de solventes constituída por clorofórmio-metanol-NH<sub>4</sub>OH 0,5N (40:10:0,5, v/v). As bandas foram visualizadas após exposição da placa a vapores de iodo-metálico (Williams et al., 1984) e posteriormente o cromatograma foi autorradiografado por exposição a filme de raio-X a - 70<sup>0</sup>C, para identificação das bandas radioativas (Mandon et al., 1991) (Figura III.5).

Paralelo às amostras, os seguintes padrões foram utilizados: DL-erythro-dihydroesfingosina (esfinganina) ( 25 µl de uma solução 0,25 µg/µl), fosfatidilserina (10 µl de sol. 1µg/µl) e L-[3-<sup>14</sup>C] serina (2 µl, solução 1mM).

## II.2.5 - CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA SERINA PALMITOILTRANSFERASE

### II.2.5.1 - Influência do Tempo de Congelamento sobre a Atividade da Serina Palmitoiltransferase

Após a obtenção da fração hipotalâmica microsomal conforme descrito (II.2.4.1), a mesma foi congelada em alíquotas a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 7, 14, 30 e 70 dias. A atividade da SPT foi determinada de acordo com os parâmetros cinéticos determinados (Figuras III.1, .2, .3, .4) após o descongelamento da alíquota e subsequente homogeneização do material.

O valor correspondente a 100% de atividade específica, se refere à dosagem da atividade da SPT em alíquota de proteína microsomal sem congelamento.

### II.2.5.2 - Influência dos Detergentes sobre a Atividade da Serina Palmitoiltransferase

Os detergentes: DNa, triton CF54, nonidet P40, triton X100, tween 20 ou tween 80, foram incorporados ao sistema de incubação da enzima em estudo, na concentração de 0,01% (Lev and Milford, 1981).

Tubos-controle que não continham os detergentes, foram incubados paralelamente.

### II.2.5.3 - Influência dos Haletos sobre a Atividade da Serina Palmitoiltransferase

Com este objetivo, cloreto de sódio, iodeto de potássio e fluoreto de sódio, foram incorporados ao sistema de incubação da SPT, na concentração de 100 mM (Lev and Milford, 1981). A atividade foi determinada de acordo com os parâmetros cinéticos determinados (Figuras III.1, .2, .3, .4).

Tubos-controle, que não continham soluções com haletos, foram incubados paralelamente.

## II.2.6 - INCORPORAÇÃO DE L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA EM ESFINGOLIPÍDIOS HIPOTALÂMICOS.

### II.2.6.1 - Marcação e Isolamento de Esfingolipídios

Os hipotálamos foram pesados, fracionados (um hipotálamo correspondeu a quatro frações semelhantes) e posteriormente transferidos para becker de 5 ml de capacidade, contendo 0,5 ml de Krebs Ringer bicarbonato (pH 7,4), acrescido de glicose 5 mM, 0,2 mM de serina e 0,5  $\mu$ Ci de L-[3-<sup>14</sup>C]serina e incubados em Banho Maria Metabólico (34°C) em atmosfera de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5). As condições de incubação para a marcação de esfingolipídios foram determinadas de acordo com as figuras III.12, .14, .15, .17. A adição de 0,2 mM de serina ao sistema de incubação foi para igualar os "pools" nos hipotálamos de animais normo e hiponutridos (Cutler et al, 1974).

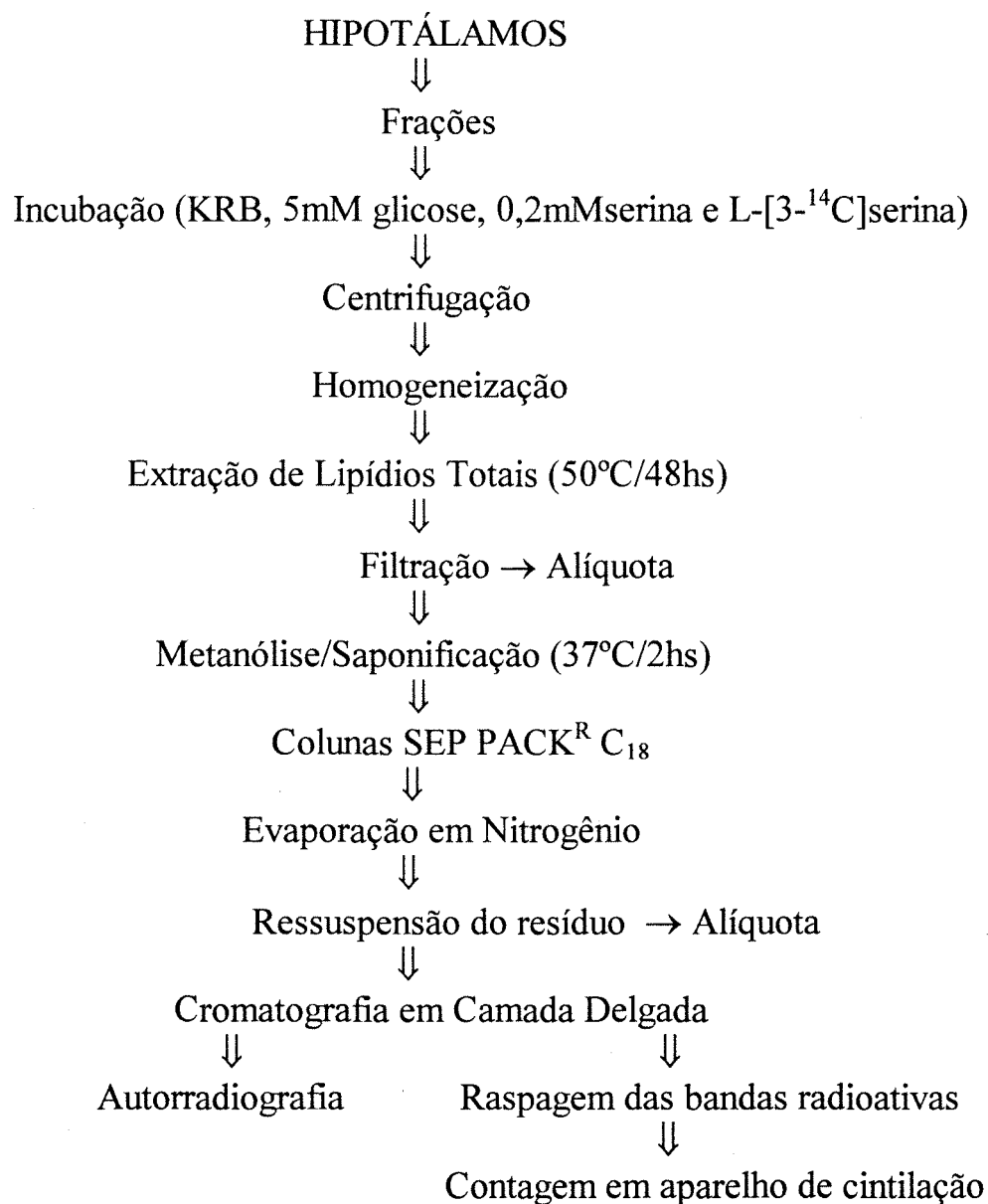
Após o período de incubação, o sistema foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos e o sedimento (tecido) foi lavado com solução fisiológica (três vezes). As fatias foram homogeneizadas (Potter-Helvehjen) e os lipídios totais extraídos com 8 ml de clorofórmio/metanol/água (60:30:6) em Banho Maria a 50°C, por 48 horas (van Echten et al., 1990) (Figura II.2).

Posteriormente, a amostra foi filtrada utilizando-se lã de vidro. Do filtrado, retirou-se uma alíquota para a determinação da incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina em lipídios totais. O restante foi evaporado em fluxo de nitrogênio. Ao resíduo resultante, acrescentou-se 4 ml de KOH 100mM e procedeu-se a saponificação das amostras por 2 horas/37°C.

Então o extrato lipídico saponificado foi centrifugado e dessalificado pelo uso de coluna de SEP PACK<sup>R</sup> C<sub>18</sub> (William and Mc Cluer, 1980), conforme descrito a seguir: a coluna foi lavada com 10 ml de metanol e 20 ml de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) por duas vezes. Após, lavou-se novamente a coluna com 10 ml de metanol e 10 ml de "Fase Superior Teórica" (clorofórmio:metanol:cloreto de potássio 0,1M 3:48:47,v/v). Então, o extrato lipídico saponificado foi aplicado por 3 vezes na coluna cromatográfica de fase-reversa. Os sais foram retirados da coluna através da adição de 10 ml de água. Finalmente, os esfingolipídios foram eluídos com 15 ml de clorofórmio;metanol (2:1,v/v) e o eluato foi evaporado em fluxo de nitrogênio.

O resíduo obtido (fração esfingolipídica) foi suspenso em 1 ml de clorofórmio/metanol (1:1) e uma alíquota (25  $\mu$ l) utilizada para avaliar a radioatividade com líquido de cintilação. Um volume de 30  $\mu$ l, contendo em torno de 2.500 cpm, foi aplicado em cromatoplasas e a separação cromatográfica realizada com clorofórmio/metanol/cloreto de cálcio aquoso a 0,22% (60:35:8). Paralelo às amostras, os seguintes padrões foram aplicados:

fosfatidilserina (10 $\mu$ l de sol. 1 $\mu$ g/ $\mu$ l), glicosilceramida (10 $\mu$ l de sol. 2 $\mu$ g/ $\mu$ l), lactosilceramida (10 $\mu$ l de sol. 2 $\mu$ g/ $\mu$ l), DL-erythro-dihydroesfingosina (25 $\mu$ l de sol. 0,25 $\mu$ g/ $\mu$ l), esfingomielina (20 $\mu$ l de sol. 1 $\mu$ g/ $\mu$ l), ceramida (10 $\mu$ l de sol. 3 $\mu$ g/ $\mu$ l), e os gangliosídeos G<sub>M3</sub> (3 $\mu$ l sol. 1 $\mu$ g/ $\mu$ l), G<sub>D3</sub> (3 $\mu$ l sol. 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l), G<sub>M2</sub> (3 $\mu$ l sol. 1 $\mu$ g/ $\mu$ l), G<sub>M1</sub> (3 $\mu$ l sol. 1 $\mu$ g/ $\mu$ l), G<sub>D1b</sub> (3 $\mu$ l sol. 1 $\mu$ g/ $\mu$ l), G<sub>D1a</sub> (3 $\mu$ l sol. 1 $\mu$ g/ $\mu$ l), G<sub>T1b</sub> (3 $\mu$ l sol. 1 $\mu$ g/ $\mu$ l).



**Figura II.2:** INCORPORAÇÃO DE L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA EM ESFINGOLIPÍDIOS HIPOTALÂMICOS.

### II.2.6.2 - Identificação e Avaliação Quantitativa dos Esfingolipídios

Após a realização da cromatografia em camada delgada, a placa cromatográfica foi autorradiografada por exposição das mesma à filme de raio-X a - 70°C por 3 semanas, para visualização das bandas radioativas. Estas, foram comparadas aos padrões revelados por exposição da placa a vapores de iodo, resorcinol (gangliosídios) ou Comassie-Blue (lactosilceramida, glicosilceramida, esfingosina e ceramida). Posteriormente, as regiões contendo lipídios radioativos foram raspadas da placa cromatográfica e contadas em aparelho de cintilação líquida (WALLAC 1409) (Figuras III.13, .16, .18).

Como controle adicional realizou-se a densitometria no aparelho HOEFER Scientific Instruments GS 60. As áreas foram avaliadas por cálculo matemático ou por pesagem.

### II.2.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados, estatisticamente, através da análise de variância de uma via, utilizando-se o programa SPSS/PC-plus. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.). As comparações entre as médias dos grupos foram realizadas pelo teste de Duncan dentro de uma mesma dieta, ou pelo teste "t" de Student entre as dietas, conforme especificado na legenda das figuras.



## **III - RESULTADOS**

### **III.1-ATIVIDADE DA ENZIMA SERINA PALMITOILTRANSFERASE**

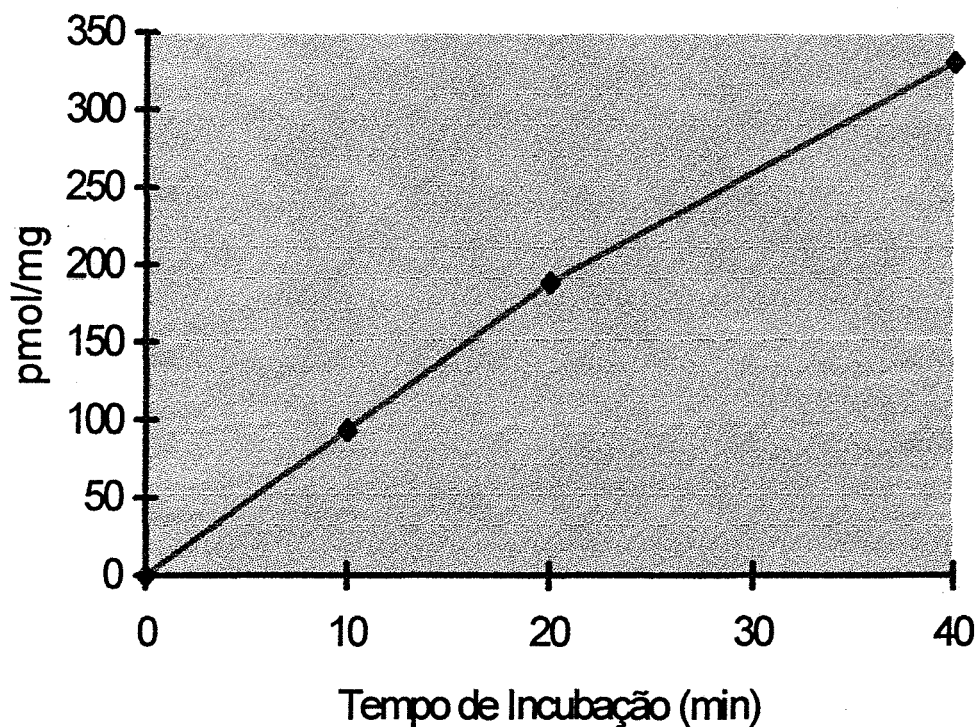
Para estudar algumas propriedades da SPT, assim como avaliar o efeito da desnutrição pré e pós-natal sobre a sua atividade estabeleceu-se, inicialmente, os parâmetros cinéticos desta enzima.

#### **III.1.1 - PARÂMETROS CINÉTICOS**

Os parâmetros cinéticos estudados para a enzima serina palmitoiltransferase em hipotálamos de ratos de 7 dias de vida pós-natal correspondem à determinação do tempo de incubação, da quantidade de proteína microssomal e da concentração dos substratos serina e palmitoil CoA.

### III.1.1.1 - Efeito da Variação do Tempo de Incubação sobre a Atividade da Serina Palmitoiltransferase

Variando-se o tempo de incubação, observa-se uma atividade proporcional ao tempo de incubação da serina palmitoiltransferase (Figura III.1). Portanto, para experimentos de avaliação da atividade específica da enzima estudada em hipotálamos de ratos durante o desenvolvimento, trabalhou-se com 20 minutos de incubação por se encontrar na faixa de linearidade da reação.

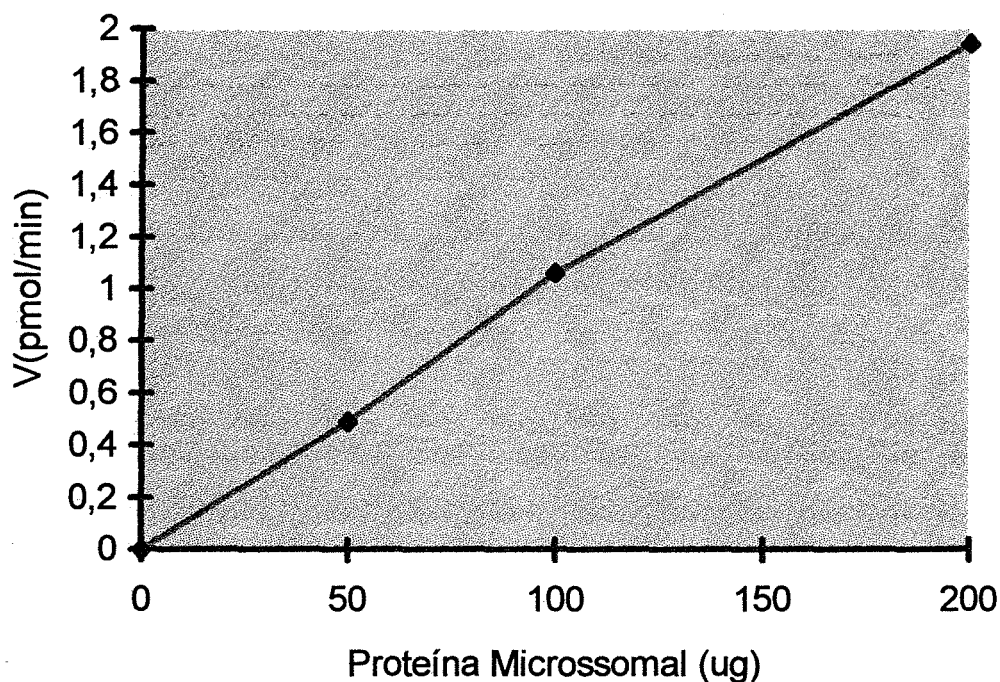


**Figura III.1 - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE DA SERINA PALMITOILTRANSFERASE.** As análises foram desenvolvidas conforme descrito em Materiais e Métodos, variando o tempo de incubação na presença de 150  $\mu\text{g}$  de proteína microssomal, 0,16 mM de palmitoil CoA e 1mM L-[3- $^{14}\text{C}$ ]serina. Os dados representam a média dos resultados obtidos em duplicata. pmol/mg representa a quantidade de L-[3- $^{14}\text{C}$ ]serina transferida, por mg de proteína.

### III.1.1.2 - Efeito da Variação da Quantidade de Proteína sobre a Atividade da Serina Palmitoiltransferase

Variando-se as concentrações de proteína microsomal no sistema de incubação da serina palmitoiltransferase, observa-se que a atividade da enzima é linear até 200  $\mu\text{g}$  e que portanto (Figura III.2).

Assim, para avaliar a atividade da serina palmitoiltransferase em hipotálamos de ratos durante o desenvolvimento, utilizou-se uma quantidade de proteína microsomal de 150  $\mu\text{g}$ .

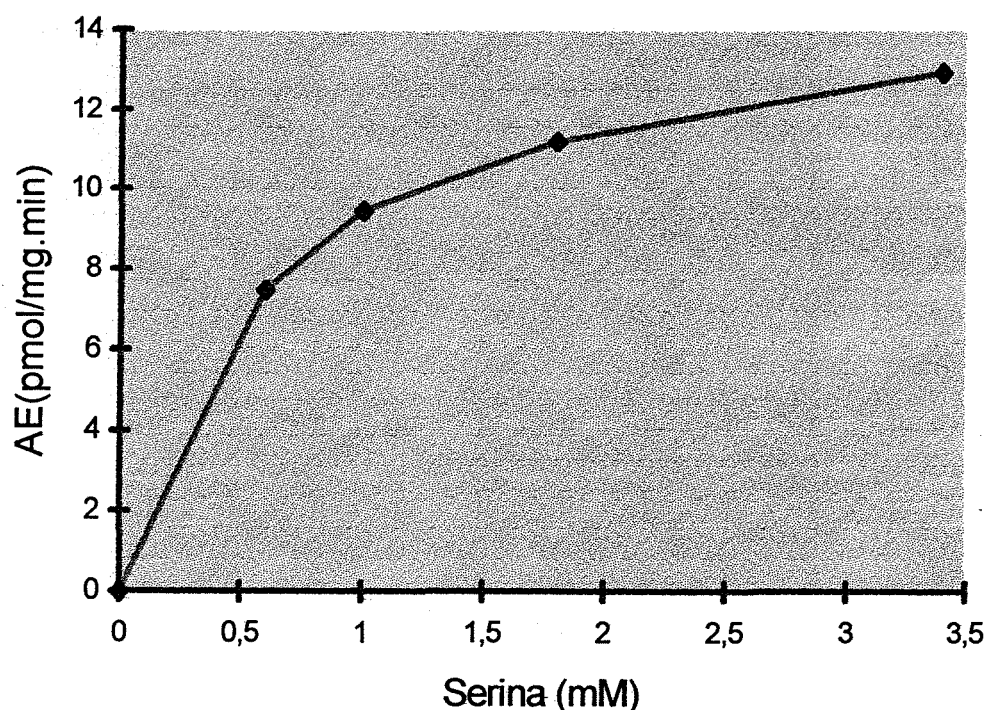


**Figura III.2 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA NA ATIVIDADE DA SERINA PALMITOILTRANSFERASE.** Diferentes quantidades de proteína microsomal foram incubadas por 20 minutos na presença de 0,16 mM de palmitoil CoA e 1 mM de L-[3- $^{14}\text{C}$ ]serina. Detalhes técnicos estão descritos em **Materiais e Métodos**. Os valores representam a média dos resultados obtidos em duplicata. V (pmol/min) representa a velocidade da enzima SPT, que expressa a quantidade de L-[3- $^{14}\text{C}$ ]serina transferida em pmol, a cada minuto de ação enzimática.

### III.1.1.3 - Efeito da Variação da Concentração de Serina sobre a Atividade da Serina Palmitoiltransferase

Variando-se as concentrações de serina, observa-se que a incorporação deste substrato varia linearmente até a concentração de 0,5 mM e a partir desta concentração ocorre uma tendência ao platô.

Assim, para experimentos de avaliação da atividade da serina palmitoiltransferase em hipotálamos de ratos durante o desenvolvimento, usamos serina em concentração de 1 mM.

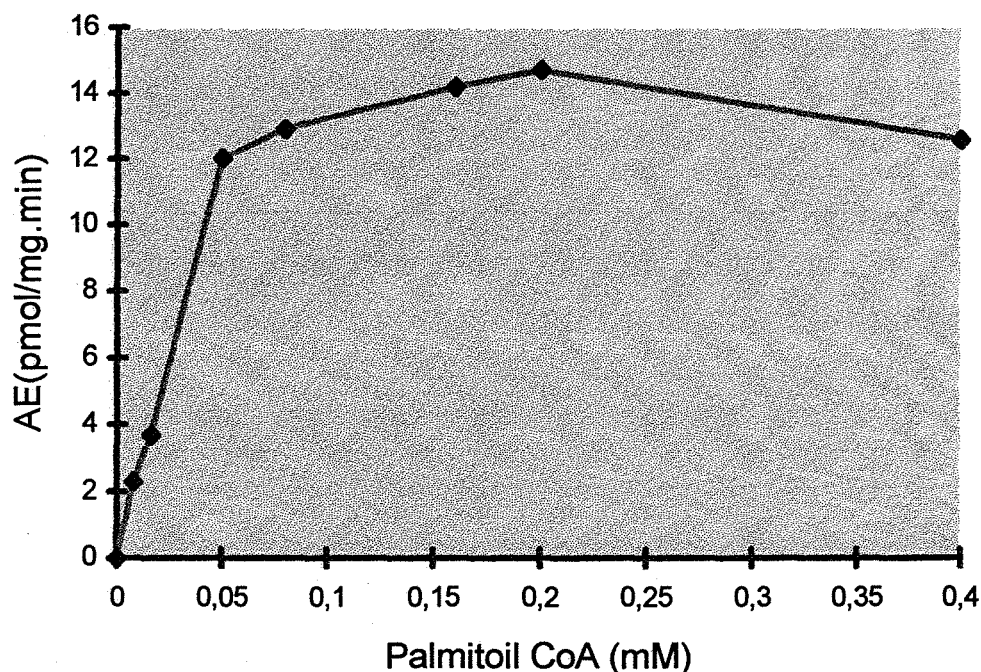


**Figura III.3 - ATIVIDADE DA SERINA PALMITOILTRANSFERASE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SERINA.** Incubou-se a mistura de reação, contendo 150  $\mu$ g de proteína microssomal, 0,16 mM de palmitoil CoA e concentrações variáveis de serina, por 20 minutos como descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam a média dos resultados obtidos em duplicata. AE (pmol/mg.min) representa a atividade específica da enzima que é expressa em quantidade de L-[3- $^{14}$ C]serina transferida, em pmol, por mg de proteína, em 1 minuto.

### III.1.1.4 - Efeito da Variação da Concentração de Palmitoil CoA sobre a Atividade da Serina Palmitoiltransferase

A curva de palmitoil CoA mostra que este substrato apresenta uma região de linearidade quando se varia a concentração do mesmo até 0,05 mM. A partir desta concentração, observa-se a saturação da enzima por este substrato e com uma concentração de palmitoil CoA superior a 0,2 mM, observa-se uma tendência à inibição da atividade enzimática (Figura III.4).

Portando, utilizando-se palmitoil CoA na concentração de 0,16 mM para os experimentos de avaliação da atividade da serina palmitoiltransferase, trabalha-se com uma quantidade saturante de substrato.

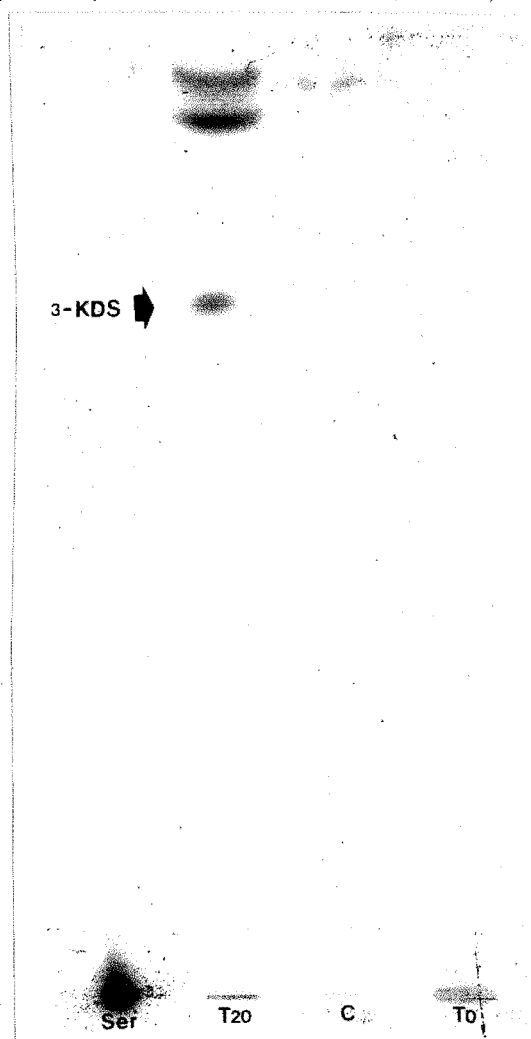


**Figura III.4 - ATIVIDADE DA SERINA PALMITOILTRANSFERASE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PALMITOIL CoA.** Diferentes quantidades de palmitoil CoA foram incubadas por 20 minutos na presença de 1 mM L-[3-<sup>14</sup>C] serina com 150 µg de proteína microssomal. Os outros componentes da reação estão descritos em Materiais e Métodos. Os dados representam a média dos valores obtidos em duplicata. AE(pmol/mg.min) representa a atividade específica da enzima, que expressa a quantidade de L-[3-<sup>14</sup>C]serina transferida, em pmol, por mg de proteína, em 1 minuto.

### III.1.2 - IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DA SPT

Com o objetivo de confirmar o produto da reação da enzima SPT, o sistema foi incubado com o dobro do volume, durante 20 minutos.

A identificação do produto deu-se por visualização de uma banda radioativa, através de autorradiografia (realizada conforme descrito em Materiais e Métodos). Esta banda corresponde ao padrão de 3-KDS e com Rf aproximado aos descritos na literatura (Williams et al., 1984; Williams et al., 1986; Hanada et al., 1990; Lynch and Fairfield, 1993).



**Figura III.5 - IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA ATIVIDADE DA SPT.** As amostras foram identificadas por CCD e as bandas radioativas visualizadas por exposição das placas de cromatografia em camada delgada à filme de raio-X, durante 3 semanas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ser: serina radioativa; T20: produto da atividade da SPT em 20 minutos de incubação em B.M./ $37^{\circ}\text{C}$ ; C: controle da reação, correspondente ao produto da atividade da SPT em sistema que continha todos os componentes, exceto palmitoil CoA; To: produto da atividade da SPT em sistema sem incubação.

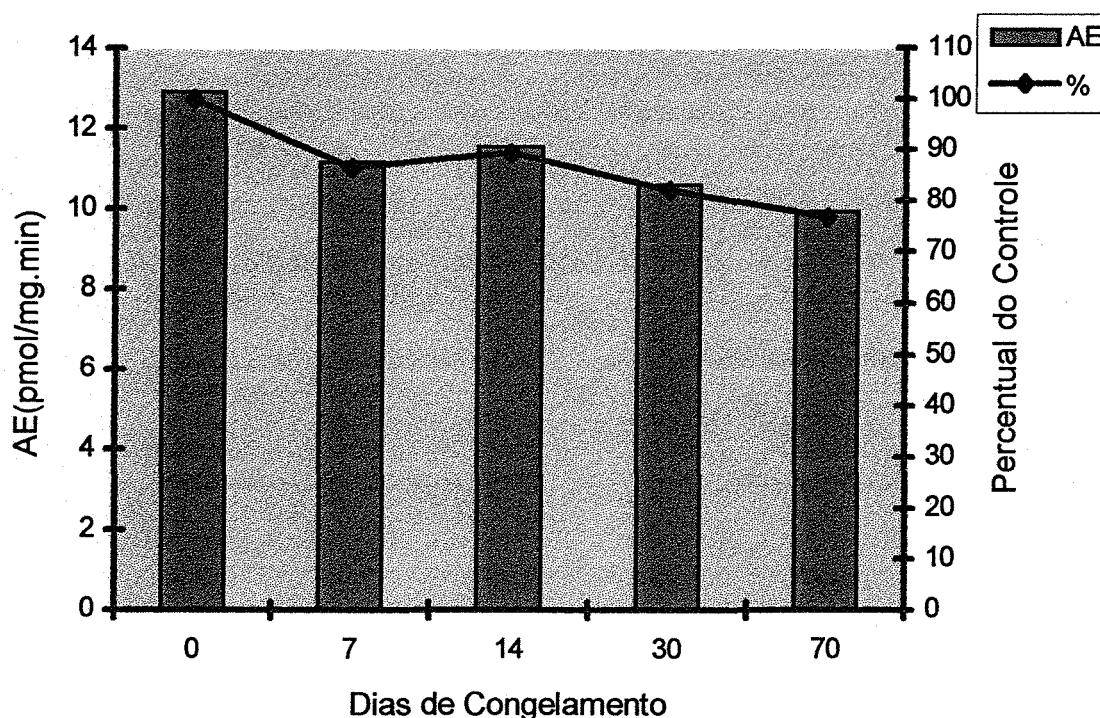
### III.1.3 - CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA SERINA PALMITOILTRANSFERASE

Com o intuito de caracterizar parcialmente a enzima, estudou-se a sua estabilidade, a ação de detergentes e de haletos sobre a atividade enzimática.

#### III.1.3.1 - Efeito da Variação do Tempo de Congelamento sobre a Atividade da Serina Palmitoiltransferase

O congelamento da suspensão microssomal a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 7, 14, 30 e 70 dias causou uma diminuição da atividade enzimática da SPT, na ordem de 14, 11, 18 e 23%, respectivamente (Figura III.6)

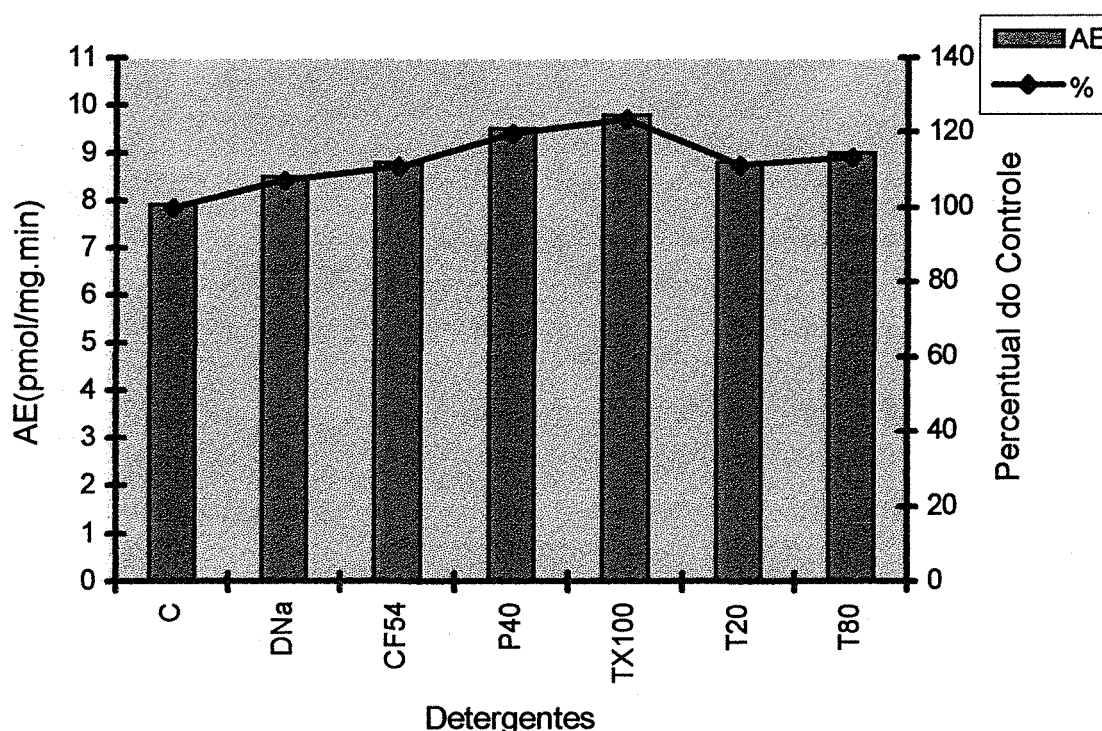
Estes dados demonstram que o tempo de congelamento não altera significativamente a atividade da enzima estudada, em pelo menos, duas semanas de congelamento.



**Figura III.6 - EFEITO DO TEMPO DE CONGELAMENTO SOBRE A ATIVIDADE DA SERINA PALMITOILTRANSFERASE.** Incubou-se a mistura de reação contendo 150  $\mu\text{g}$  de proteína microssomal, 1mM  $[3-^{14}\text{C}]$ serina e 0,16 mM de palmitoil CoA por 20 minutos/ $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação. Os pontos representam a média dos resultados obtidos em duplicata. Os resultados são expressos em A.E. e em percentual relacionado à atividade específica da enzima sem congelamento. AE(pmoli/mg.min): corresponde a quantidade em L- $[3-^{14}\text{C}]$ serina transferida, em pmol, por mg de proteína, em um minuto.

### III.1.3.2 - Efeito de Diversos Detergentes sobre a Atividade da Serina Palmitoiltransferase

Observa-se, em relação ao controle, que os detergentes em estudo causaram uma ligeira variação de 7 a 24% na atividade da SPT (Figura III.7). Triton X100 foi o detergente que proporcionou um aumento maior na atividade desta enzima, na ordem de 23,5%.



**Figura III.7 -EFEITO DE DETERGENTES SOBRE A ATIVIDADE DA SERINA PALMITOILTRANSFERASE.** Detergentes em concentração de 0,01% foram adicionados ao sistema de incubação da serina palmitoiltransferase constituída por 1mM L-[3-<sup>14</sup>C]serina, 0,16 mM de palmitoil CoA, 150µg de proteína microsomal por um tempo de incubação de 20 minutos. Os valores representam a média dos resultados obtidos em duplicata. Os resultados são expressos em percentual relacionado à atividade específica da enzima nos tubos-controle. C: controle; DNa: desoxicolato de sódio; CF54: triton CF54; P40: nonidet P40; TX100: triton X100; T20: tween 20; T80: tween 80. AE(pmol/mg.min) representa a atividade específica da enzima, que expressa a quantidade de L-[3-<sup>14</sup>C]serina transferida, por mg de proteína, em 1 minuto.

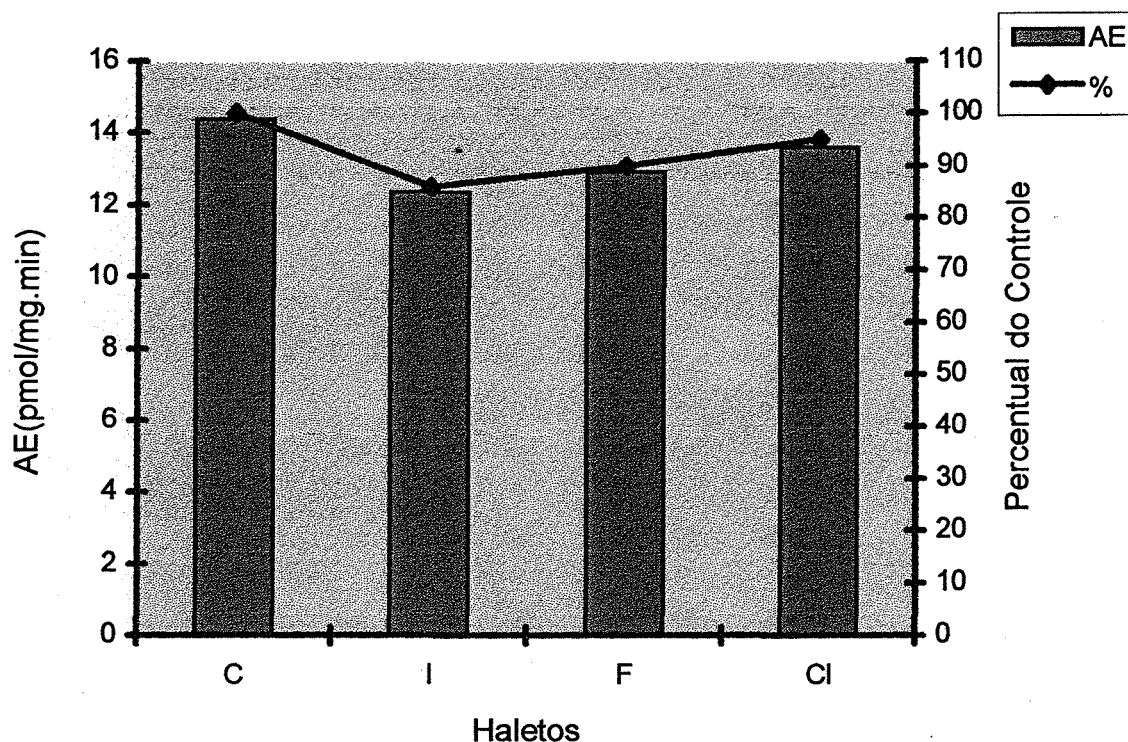


### III.1.3.3 - Efeito dos Diversos Haletos sobre a Atividade da Serina Palmitoiltransferase

Sabendo-se que alguns haletos alteraram a atividade da SPT (Lev and Milford, 1981), decidimos estudar a influência destas substâncias em hipotálamos de ratos.

A SPT obtida da fração microsossomal de hipotálamos de ratos jovens mostrou-se com atividade enzimática específica levemente diminuída, ao ser incubada na presença de iodeto, fluoreto e cloreto, na ordem de 14, 10 e 5%, respectivamente (Figura III.8).

Isso demonstra que estes ânions podem não alterar a atividade da enzima estudada.



**Figura III.8** - EFEITO DOS HALETOS SOBRE A ATIVIDADE DA SERINA PALMITOILTRANSFERASE. Soluções de 100 mM dos haletos foram adicionados ao sistema de incubação da serina palmitoiltransferase: 1mM L- [3-<sup>14</sup>C]serina, 0,16 mM de palmitoil CoA, 150µg de proteína microsossomal por um tempo de incubação de 20 minutos. Os valores representam a média dos resultados obtidos em dois experimentos em duplicata. Os resultados foram expressos em percentual relacionado à atividade específica da enzima nos tubos-controle. C; controle; I: iodeto; F: fluoreto e Cl: cloreto. AE(pmol/mg.min) representa a atividade específica da enzima, que expressa a quantidade de L- [3-<sup>14</sup>C]serina, por mg de proteína, em 1 minuto.

### III.1.4 - EFEITO DA HIPONUTRIÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DA SPT

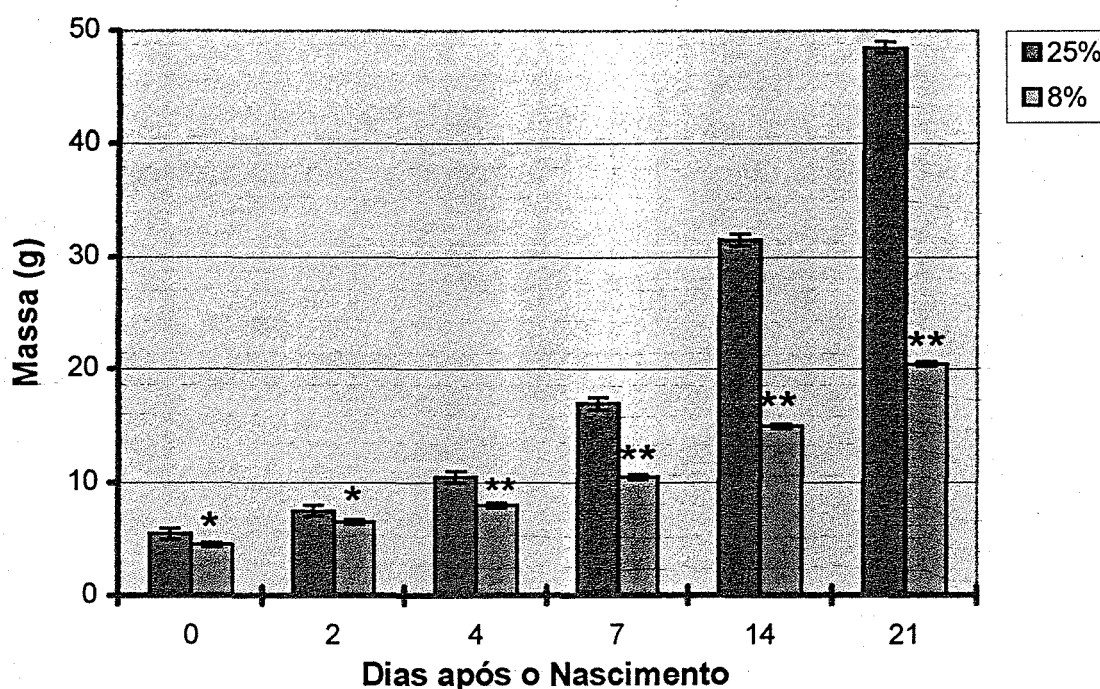
A atividade da serina palmitoiltransferase foi avaliada conforme os parâmetros cinéticos previamente estabelecidos (Figuras III.1, .2, .3, .4), seguindo o esquema de composição das dietas, conforme referido em Materiais e Métodos.

O efeito da hiponutrição foi controlado através de dois parâmetros principais: massa corporal e massa hipotalâmica.

#### III.1.4.1 - Controle do Modelo de Hiponutrição

##### III.1.4.1.1 - *Massa Corporal*

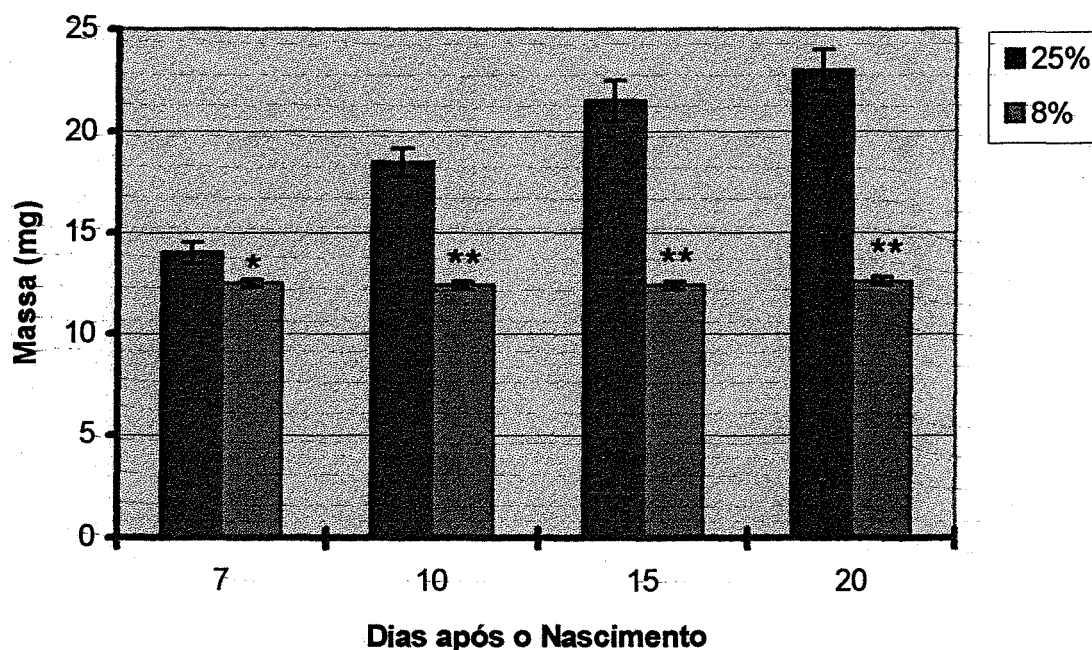
A hiponutrição imposta reduziu, significativamente, a massa corporal por ocasião do nascimento. A massa corporal dos ratos aos 21 dias de idade, alimentados com dieta hipoprotéica foi 60% menor do que a observada em ratos controles (Figura III.9).



**Figura III.9** - MASSA CORPORAL DE RATOS NORMO E HIPONUTRIDOS. Os pontos representam a média  $\pm$  EP de 30-50 ratos. As médias foram comparadas pelo teste "t" de Student. As médias de ratos normo-nutridos diferem das médias dos ratos hiponutridos (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ .

### III.1.4.1.2 - Massa Hipotalâmica

No grupo normonutrido, a massa hipotalâmica cresceu mais, dos sete aos dez dias e a partir daí, o incremento foi menor. No grupo hiponutrido não houve variação nas massas hipotalâmicas, no período estudado (Figura III.10). As massas dos hipotálamos nos ratos hiponutridos foram menores que as dos ratos normonutridos em todas as idades estudadas.

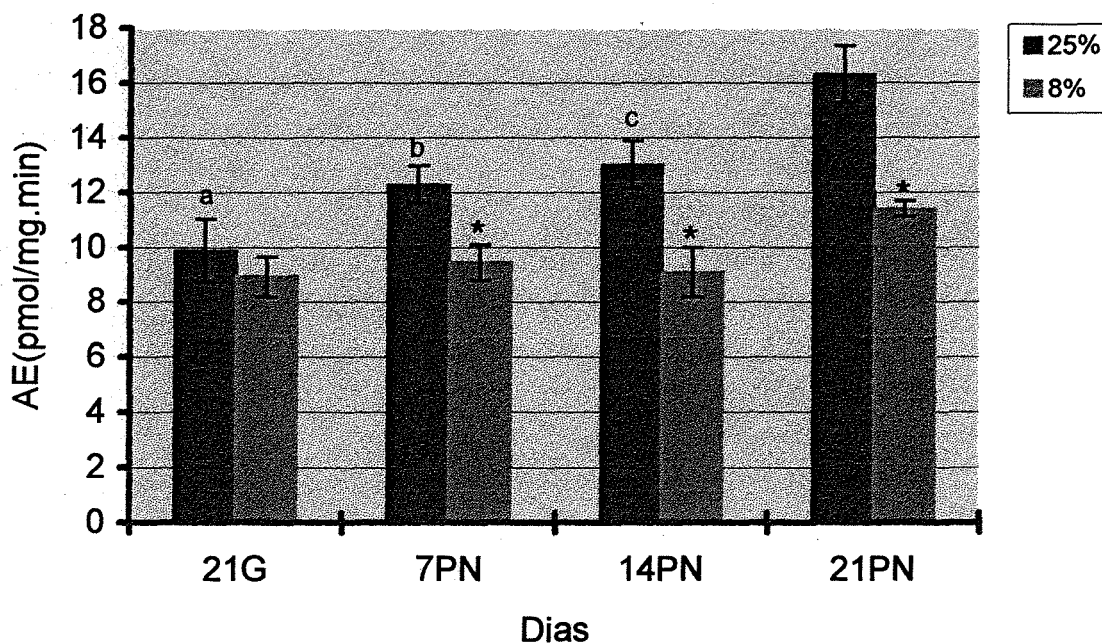


**Figura III.10** - MASSA HIPOTALÂMICA DE RATOS NORMO E HIPONUTRIDOS. As barras representam a média  $\pm$  EP de 16-32 hipotálamos. As médias foram comparadas pelo teste "t" de Student. (\*) normonutridos diferem dos hiponutridos ( $p < 0,05$ ); (\*\*) normonutridos diferem dos hiponutridos ( $p < 0,01$ ).

### III.1.4.2 - Atividade da SPT em Hipotálamos de Ratos Normo e Hiponutridos durante o Desenvolvimento

A atividade específica da serina palmitoiltransferase aumenta com o desenvolvimento em ratos normonutridos, do vigésimo-primeiro dia gestacional até a terceira semana de vida pós-natal. Em ratos hiponutridos, a atividade específica da enzima em estudo não se alterou estatisticamente durante as idades estudadas.

Aos 21 dias de gestação, a atividade da serina palmitoiltransferase em ratos normo e hiponutridos não mostrou diferença estatística. Aos 7, 14 e 21 dias de vida pós-natal, a atividade específica da serina palmitoiltransferase foi estatisticamente menor nos hipotálamos de ratos hiponutridos, quando comparada com a do seu respectivo controle (Figura III.11).



**Figura III.11 - ATIVIDADE DA SERINA PALMITOILTRANSFERASE EM HIPOTÁLAMOS DE RATOS NORMO E HIPONUTRIDOS, DURANTE O DESENVOLVIMENTO.** Os valores correspondem à média de 5-9 determinações  $\pm$  E.P. (a) 21G difere estatisticamente de 14 PN e 21 PN ( $p < 0,05$ ). (b) 7 PN difere estatisticamente de 21 PN ( $p < 0,05$ ). (c) 14 PN difere estatisticamente de 21 PN ( $p < 0,05$ ). (\*) 8% difere estatisticamente de 25% ( $p < 0,01$ ). As médias foram comparadas dentro de uma mesma dieta pelo teste de Duncan e entre as dietas, pelo teste "t" de Student. 21G: 21º dia gestacional; 7PN, 14PN, 21PN: 7º, 14º e 21º dia de vida pós-natal. AE (pmol/mg.min) representa a atividade específica da enzima, que expressa a quantidade de L-[3-<sup>14</sup>C]serina transferida, por mg de proteína, em 1 minuto.

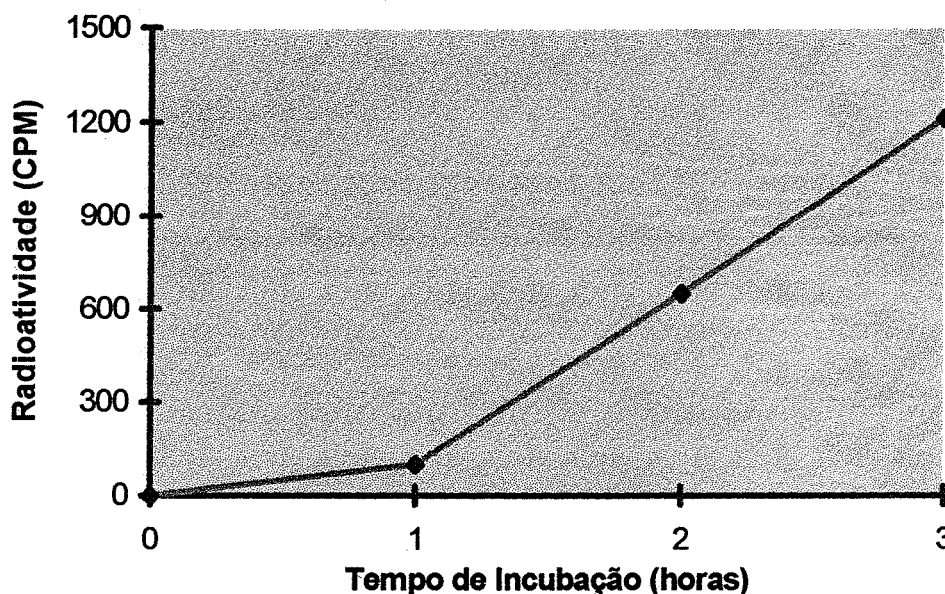
## III.2 - INCORPORAÇÃO DE L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA EM ESFINGOLIPÍDIOS HIPOTALÂMICOS

Sabendo-se que a enzima limitante da síntese de esfingolipídios apresentava uma menor atividade em animais hiponutridos, pretendemos avaliar de forma indireta o efeito da hiponutrição sobre outras enzimas desta via metabólica. Para isto, se avaliou a rota de síntese de forma indireta, determinando a incorporação do precursor L-[3-<sup>14</sup>C]serina no “esqueleto lipídico” de alguns intermediários e produtos finais da mesma. Para isso, primeiramente estabelecemos as condições de incubação e posteriormente trabalhamos com ratos de 21 dias, idade na qual a SPT mostrou maior diferença de atividade em ratos normo e hiponutridos.

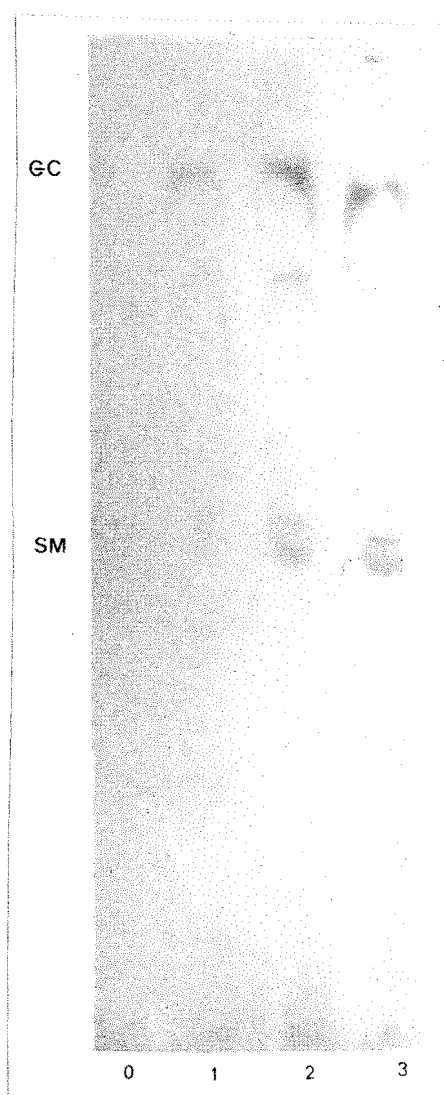
### III.2.1 - PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE INCORPORAÇÃO DE L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA EM ESFINGOLIPÍDIOS

#### III.2.1.1 - Efeito da Variação do Tempo de Incubação sobre a Incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]Serina em Esfingolipídios

Variando-se o tempo de incubação, a incorporação do precursor radioativo em esfingolipídios totais, aumenta com o tempo de incubação (Figura III.12).



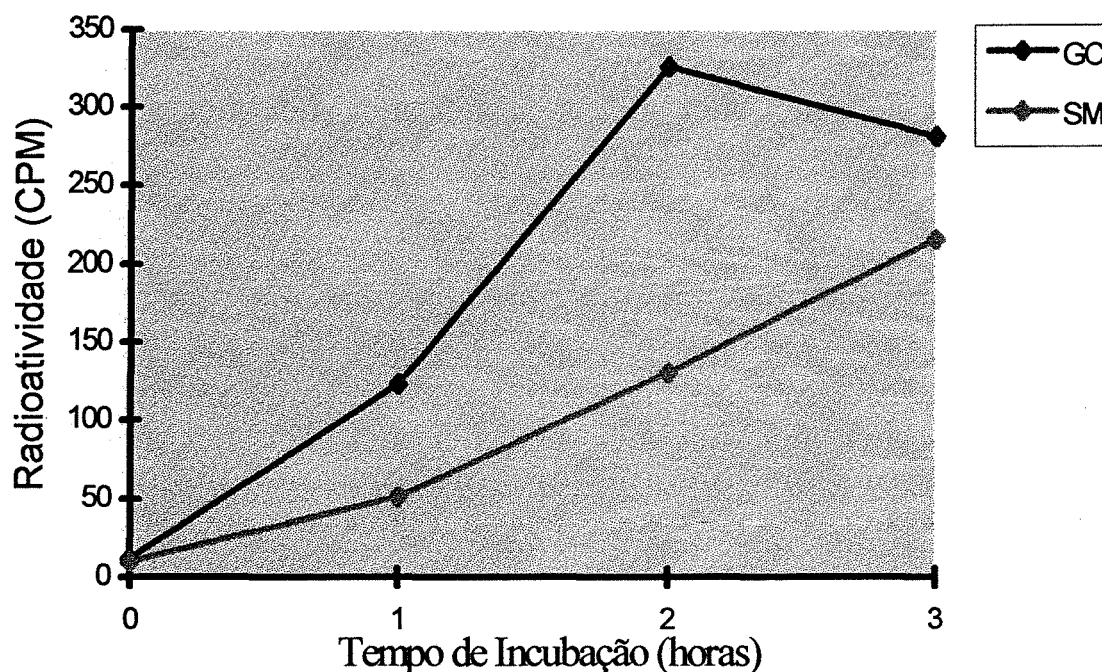
**Figura III.12** - EFEITO DA VARIAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA INCORPORAÇÃO DE L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA EM ESFINGOLIPÍDIOS TOTAIS. As análises foram desenvolvidas conforme descrito em Materiais e Métodos, variando o tempo de incubação na presença de 40 mg de tecido hipotalâmico. Os dados são referentes a um experimento representativo.



**Figura III.13** - IDENTIFICAÇÃO DOS DIFERENTES ESFINGOLIPÍDIOS APÓS A INCUBAÇÃO L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA, VARIANDO-SE O TEMPO DE INCUBAÇÃO. A C.C.D. foi desenvolvida conforme descrito em Materiais e Métodos e exposta à filmes de raio-X por 3 semanas a -70°C. GC: glicosilceramida; SM: esfingomiéline. 0,1,2 e 3 representam o tempo de incubação, em horas.

Analisando-se as principais frações esfingolípídicas, observa-se que a incorporação do precursor radioativo é linear até 2 e 3 horas, respectivamente, para glicosilceramida e esfingomiéline (Figuras III.13 e III.14).

Condição idêntica foi utilizada anteriormente para a incorporação de 6- $[^3\text{H}]$ glicosamina em gangliosídios hipotalâmicos (Trindade et al., 1995).

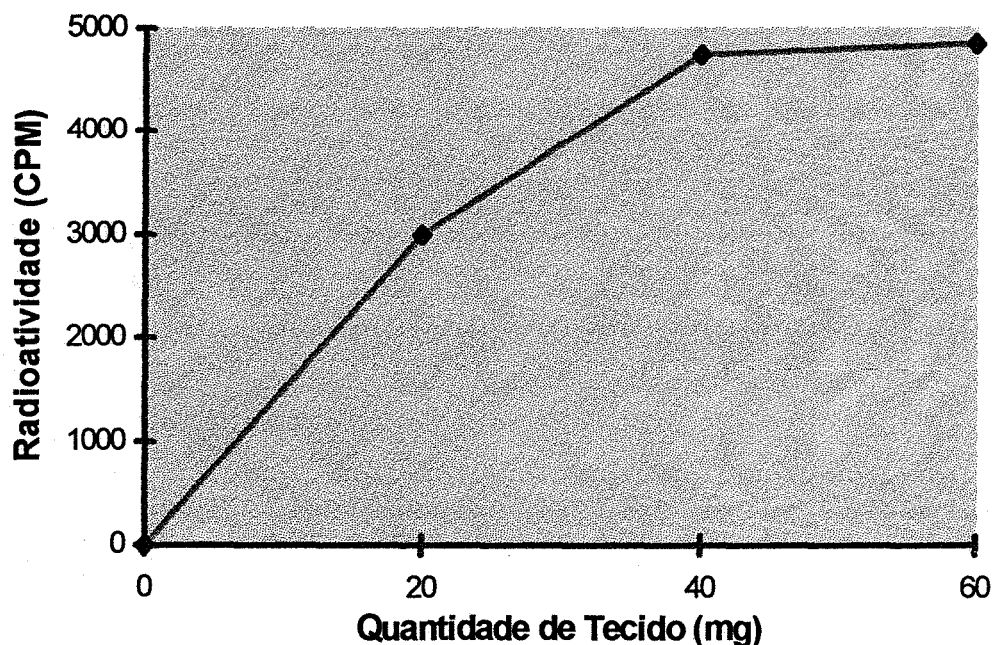


**Figura III.14** - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A INCORPORAÇÃO DE L-[3- $^{14}\text{C}$ ]SERINA EM DIFERENTES ESFINGOLÍPIDIOS. As análises foram desenvolvidas conforme descrito em Materiais e Métodos, variando o tempo de incubação das fatias hipotalâmicas. GC: glicosilceramida; SM: esfingomiéline. Os dados correspondem a um experimento representativo.



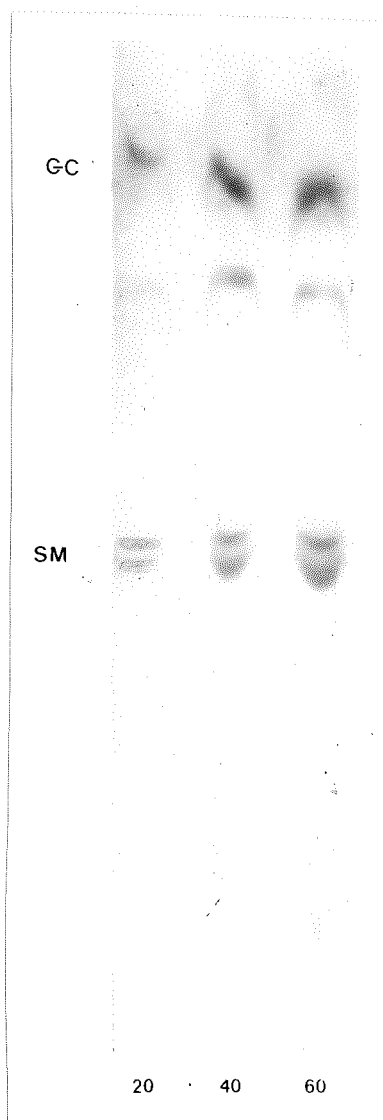
### III.2.1.2 - Efeito da Variação da Quantidade de Tecido na Incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]Serina em Esfingolipídios

Variando-se a quantidade de tecido incubado durante 2 horas e 30 minutos, observa-se que a incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina nos esfingolipídios totais (Figura III.15), assim como nas principais frações esfingolipídicas (Figuras III.16 e III.17), aumenta com a quantidade de tecido utilizada. Assim sendo, os experimentos posteriores foram realizados utilizando-se 40 mg de tecido.

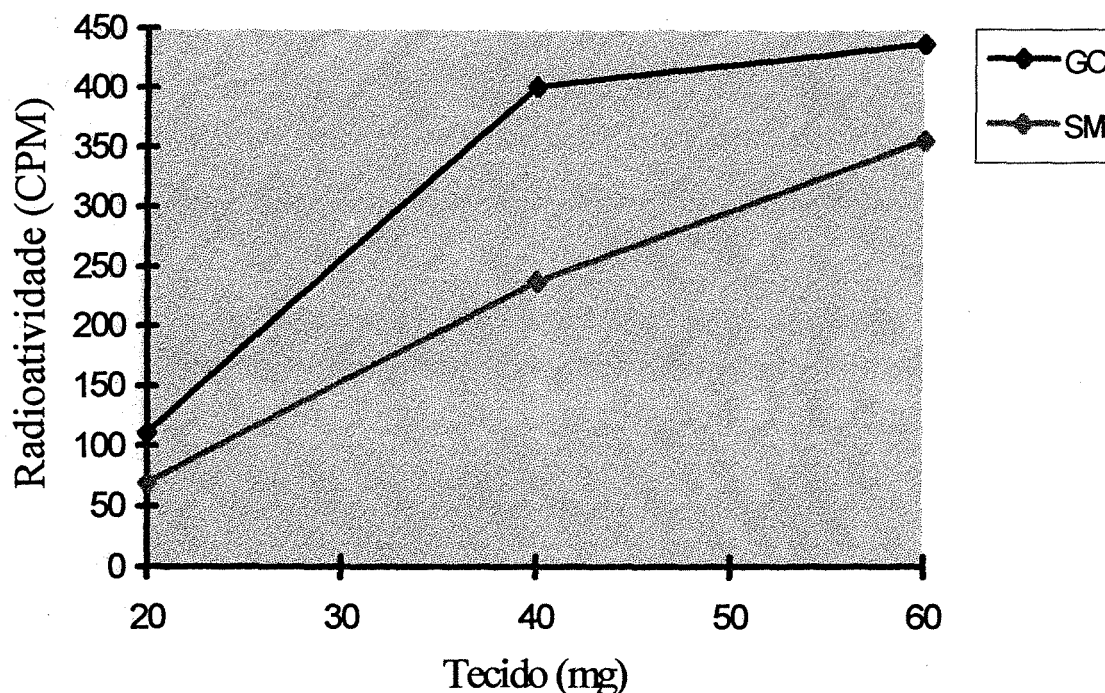


**FIGURA III.15** - EFEITO DA VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DE TECIDO SOBRE A INCORPORAÇÃO DE L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA EM ESFINGOLIPÍDIOS TOTAIS. As análises foram realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos, variando-se a quantidade de tecido e incubando-se durante 2 horas e 30 minutos. Os dados correspondem a um experimento representativo.





**Figura III.16** - IDENTIFICAÇÃO DOS DIFERENTES ESFINGOLIPÍDIOS OBTIDOS APÓS A INCUBAÇÃO COM L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA, VARIANDO-SE A QUANTIDADE DE TECIDO. A C.C.D. foi desenvolvida conforme descrito em *Materiais e Métodos* e exposta à filme de raio-X por 3 semanas a -70°C. GC: glicosilceramida; SM: esfingomielina. 20, 40 e 60 representam a quantidade de tecido incubado, expressa em mg.



**Figura III.17** - EFEITO DA VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DE TECIDO NA INCORPORAÇÃO DE L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA EM DIFERENTES ESFINGOLIPÍDIOS. As análises foram desenvolvidas conforme descrito em Materiais e Métodos, variando-se a quantidade de tecido hipotalâmico em 2 horas e 30 minutos de incubação. Os dados representam os valores obtidos em um experimento representativo. GC: glicosilceramida; SM: esfingomielina. Os dados correspondem a um experimento representativo.

### III.2.2 - INCORPORAÇÃO DE L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA EM ESFINGOLIPÍDIOS HIPOTALÂMICOS DE RATOS NORMO E HIPONUTRIDOS DE 21 DIAS DE IDADE

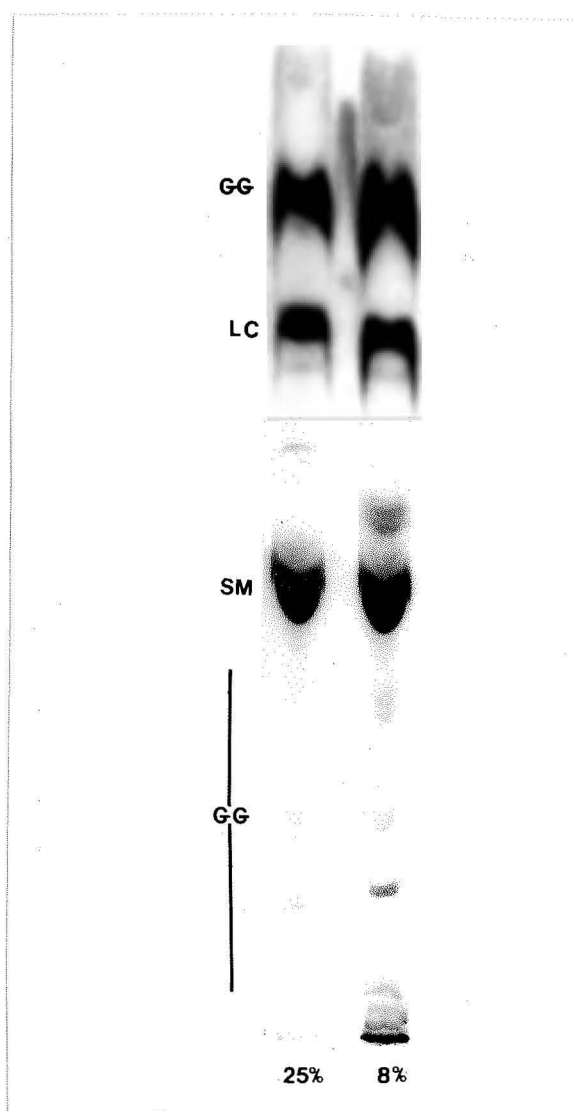
#### III.2.2.1 - Incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina na Fração Esfingolipídica Total.

A incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina nos esfingolipídios totais de hipotálamos de ratos hiponutridos com 21 dias de idade pós-natal foi menor que seu respectivo controle (Tabela III.1).

#### III.2.2.2 - Incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina nos Diferentes Esfingolipídios

Analisando as diferentes frações esfingolipídicas (glicosilceramida, lactosilceramida, esfingomielina e gangliosídios) (Figura III.18), observou-se

que as incorporações do precursor radioativo foram menores em hipotálamos de ratos hiponutridos, do que em animais normonutridos (Tabela III.1).



**Figura III.18** - INCORPORAÇÃO DE L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA EM ESFINGOLIPÍDIOS HIPOTALÂMICOS DE RATOS NORMO E HIPONUTRIDOS DE 21 DIAS DE IDADE. A C.C.D. foi desenvolvida conforme descrito em Materiais e Métodos e exposta à filmes de raio-X por 3 semanas a -70°C. GC: glicosilceramida; LC:lactosilceramida; SM: esfingomiéline; GG: gangliosídios. 25%: ratos normonutridos; 8%: ratos hiponutridos.

**Tabela III.1 - INCORPORAÇÃO DE L-[3-<sup>14</sup>C]SERINA EM ESFINGOLIPÍDIOS HIPOTALÂMICOS DE RATOS NORMO E HIPONUTRIDOS DE 21 DIAS DE IDADE PÓS-NATAL<sup>1,2</sup>**

DIETA	25%		8%		
	Compostos <sup>3</sup>	%	cpm/mg proteína	%	cpm/mg proteína
	SPLs Totais		1402 ±69		1080*±127
	GC	29,4±5,5	412 ±20	33,0±2,8	320* ±31
	LC	19,8 ±4,8	277 ±14	20,2±2,4	195**±19
	SM	13,4 ±4,0	187 ± 9	9,6±3,2	93**± 9
	GG	28,9±0,5	405± 2	29,6±3,4	287* ±28

Os valores correspondem à média de 3-4 determinações ± E.P.

(1) Os valores são expressos em percentual.

(2) Os valores são expressos em cpm/mg de proteína e os valores dos diferentes esfingolipídios foram obtidos relacionando os percentuais referentes aos valores relativos às bandas radiomarcadas da C.C.D., com o valor absoluto da incorporação de serina em esfingolipídios totais.

(3) A diferença entre o somatório dos valores de GC (glicosilceramida), LC (lactosilceramida), SM(esfingomielina) e GG (gangliosídios), corresponde ao valor de uma banda radioativa não identificada, acima da banda da esfingomielina.

As médias foram comparadas pelo teste "t" de Student.

(\* ) Normonutridos diferem de hiponutridos ( $p < 0,05$ ).

(\*\* ) Normonutridos diferem de hiponutridos ( $p < 0,02$ ).

## IV - DISCUSSÃO

A hiponutrição provoca alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas no S.N.C. (Morgane et al., 1978), principalmente quando imposta no período vulnerável do crescimento cerebral (Dobbing and Sands, 1971).

Os esfingolipídios (gangliosídios e esfingomielina) participam de várias fases do desenvolvimento do S.N.C.: diferenciação celular, sinaptogênese, mielogênese e transdução de sinais (Maccioni et al., 1988; Merrill, 1991; Riboni et al., 1994). Estes processos podem ser afetados pela hiponutrição, de forma diferente, nas diversas regiões cerebrais (Morgane et al., 1978).

Durante os últimos dez anos, o nosso laboratório estuda o metabolismo dos gangliosídios como um parâmetro para avaliar os efeitos da hiponutrição. Uma das estruturas cerebrais escolhida foi o hipotálamo, que junto com a hipófise, constitui uma unidade funcional neuro-endócrina, regulando várias funções fisiológicas.

O estudo da biossíntese dos gangliosídios em hipotálamos de ratos normo e hiponutridos em diferentes idades, detectou uma alteração nas atividades das enzimas  $G_{D3}$  e  $G_{M2}$  sintases (enzimas reguladoras de duas diferentes rotas de síntese de gangliosídios), nos animais hiponutridos, comparados com os seus controles, aos 21 dias de gestação (Trindade et al., 1993). O perfil dos principais gangliosídios também é modificado. Nos hipotálamos de ratos hiponutridos de 21 dias de gestação, predominou o gangliosídio  $G_{D3}$ , o qual é característico de períodos iniciais da embriogênese. Entretanto, nos hipotálamos de ratos normonutridos de 21 dias de gestação, os gangliosídios  $G_{M1}$  e  $G_{D1a}$ , típicos da sinaptogênese, foram encontrados em maior proporção, comparado com o hipotálamos de ratos hiponutridos (Trindade et al., 1995). Estes resultados demonstraram, bioquimicamente, um atraso no desenvolvimento hipotalâmico, determinado pela hiponutrição.

Além disto, foi verificado que a desnutrição protéica pré e pós-natal provoca uma redução na concentração de gangliosídios hipotalâmicos. (Trindade et al., 1992). Este fato parece não ser devido a um aumento na degradação de gangliosídios, já que a atividade da neuraminidase não varia com a desnutrição (Trindade, 1993). Portanto, a diminuição na concentração de gangliosídios hipotalâmicos determinada pela hiponutrição pré e pós-natal poderia ser devida: (1) a alterações nos conteúdos dos precursores biossintéticos dos gangliosídios como: esfinganina, ceramida, glicosilceramida ou (2) alterações nos conteúdos dos nucleotídios doadores de glicídios.

Para testar a primeira hipótese, esta dissertação de mestrado avaliou os efeitos da hiponutrição pré e pós-natal sobre a atividade da serina palmitoiltransferase em hipotálamos de ratos normo e hiponutridos, durante o

desenvolvimento e estudou o efeito da restrição alimentar sobre a incorporação do precursor L-[3-<sup>14</sup>C]serina no “esqueleto lipídico” de alguns intermediários da síntese dos esfingolipídios e produtos finais da mesma, em hipotálamos de ratos normo e hiponutridos de 21 dias após o nascimento.

A serina palmitoiltransferase (EC 2.3.1.50) é a enzima limitante da rota biossintética *de novo* dos esfingolipídios, a qual é iniciada com a formação de 3-cetoesfinganina, a partir de palmitoil CoA e serina, por ação da SPT, uma enzima piridoxal 5'-fosfato-dependente. O ensaio é baseado na incorporação de serina radioativa (Merril et al., 1991; van Echten, 1990).

Em 1981, Lev e Milford, trabalhando com a enzima parcialmente purificada de *Bacterioides melaninogenicus*, uma bactéria anaeróbia, determinaram que: o pH ótimo encontrava-se entre 7,0 e 7,6; a resposta ao aumento da concentração de serina seguia uma cinética Michaeliana, alcançando um valor máximo a aproximadamente 6 mM. A resposta ao aumento da concentração de palmitoil CoA, na presença de um excesso de serina é linear até 0,04 mM. Níveis relativamente altos de palmitoil CoA (superiores a 6 mM) não inibiram a atividade da SPT. O valor do  $K_m$  calculado a partir destes dados foi de 1,13 mM para serina e o valor para palmitoil CoA produziu um resultado considerado anômalo pelos autores.

Em outro estudo, Williams et al. (1984), trabalhando com microsomas de fígados de ratos, estudaram a dependência da atividade da SPT sob vários parâmetros: a formação de 3-KDS foi linear com o tempo, por no mínimo 10 minutos e proporcional à concentração de enzimas até 150 µg. Após períodos de tempo mais longos ou maior concentração de proteínas, a atividade foi diminuída devido a remoção competitiva do palmitoil CoA por hidrolases presentes em microsomas de fígado de ratos. A máxima atividade foi obtida com pH 6,7 e 8,6. O  $K_m$  aparente para a serina foi de 0,67 mM e a SPT foi estável com a temperatura de 37°C e com o aumento da temperatura até 50°C.

Trabalhando com microsomas da aorta de coelhos, Williams et al. (1986), obtiveram um  $K_m$  de 0,9 mM variando as concentrações de serina (valor similar ao encontrado em fígados de ratos). Variando a concentração de palmitoil CoA no ensaio, observou-se um platô entre 0,15 e 0,2 mM; uma atividade mais baixa foi encontrada com maiores concentrações de palmitoil CoA. A atividade da enzima foi máxima para pH entre 8 e 9.

Em 1991, trabalhando com S.N.C., Mandon et al., caracterizaram a SPT cerebelar, trabalhando com microsomas de células de camundongos em cultura. A atividade da SPT foi linear com o tempo até 20 minutos e proporcional à concentração de proteína microsomal, na ordem de 40-500 µg, sugerindo que, em contraste com o determinado para fígado (Williams et al., 1984), não havia interferência de outras enzimas. A formação de 3-KDS foi

dependente da adição de palmitoil CoA e serina, com valores aparentes de  $K_m$  de 0,05 mM e 0,6 mM, respectivamente. Variando-se a concentração de palmitoil CoA, a atividade alcançou um platô a aproximadamente 0,1 mM, permanecendo constante até 0,2 mM. Em concentrações mais altas, observou-se uma inibição pelo substrato. Elevadas concentrações de serina (1mM), foram requeridas para a atividade enzimática e a faixa de pH situou-se entre 7,2 e 7,6. A enzima permaneceu estável à temperatura de 37°C, durante 40 minutos e sua temperatura de desnaturação correspondeu a 50°C.

Nossos resultados demonstraram que a atividade da SPT elevava-se com a variação do tempo de incubação (Figura III.1); que a atividade da SPT é linear até 200µg de proteína microssomal (Figura III.2); que a incorporação de serina varia linearmente até a concentração de 0,5 mM e a partir daí ocorre uma tendência ao platô (Figura III.3); que variando-se as concentrações de palmitoil CoA, ocorre saturação da enzima pelo substrato em concentrações superiores a 0,05 mM e em concentrações superiores a 0,2 mM observa-se uma tendência à inibição da enzima pelo substrato (Figura III.4).

Com base nisto, para os experimentos de avaliação da atividade da SPT em hipotálamos de ratos, trabalhamos com um sistema de incubação composto por 150 µg de proteína microssomal, por 1 mM de serina (A.E. 10 mCi/mmol), 0,16 mM de palmitoil CoA e por tampão HEPES 50 mM a pH 7,4. Este sistema foi incubado a 37°C, durante um tempo de 20 minutos, sob agitação constante.

Estes resultados concordaram com os determinados previamente para o SNC, utilizando células cerebelares em cultura (Mandon et al., 1991) e para microssomas da aorta de coelhos (Williams et al., 1986), considerando o tempo de incubação, a quantidade de proteína microssomal, as concentrações de palmitoil CoA e de serina. Comparativamente ao estudo com microssomas de fígado de ratos (Williams et al., 1984), o tempo de incubação mostrou valores diferentes, onde o platô era atingido aos 10 minutos.

Os valores do  $K_m$  aparente obtidos por nós e calculados a partir do gráfico duplo-recíproco, evidenciaram valores de 0,8 mM e 0,06 mM para serina e palmitoil CoA, respectivamente. O valor obtido para serina, é muito próximo com o determinado para os tecidos animais (0,6 - 0,9 mM) (Williams et al., 1984; Williams et al., 1986; Holleran et al., 1990; Mandon et al., 1991) e discorda do valor obtido para plantas, trabalhando-se com suspensão microssomal obtida de *Curcubita pepo L.*: 1,76 mM (Lynch and Fairfield, 1993). O valor de palmitoil CoA esteve de acordo com o reportado por Mandon et al. (1991), trabalhando com células cerebelares em cultura.

Nos estudos sobre a caracterização da SPT, o tempo de congelamento da fração microssomal a -70°C evidenciou uma diminuição na atividade

enzimática da enzima em estudo, na ordem de 14-23% (Figura III.6), com um decréscimo máximo determinado aos 70 dias de congelamento da fração microssomal. Os valores obtidos sugeriram que o tempo de congelamento da fração microssomal de hipotálamos de ratos pode não alterar a atividade da enzima serina palmitoiltransferase, em pelo menos, duas semanas de congelamento. Mandon et al. (1991) reportaram que as preparações microssomais de células cerebelares de rato em cultura, podem ser estocadas por um mês a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sem perda da atividade da SPT. Lynch e Fairfield (1993), trabalhando com microssomas de plantas, encontraram dados semelhantes. Williams et al. (1984) demonstraram não haver perda da atividade da SPT, por até 6 meses, estocando as amostras a  $-80^{\circ}\text{C}$  em alíquotas acrescidas de glicerol na concentração de 20%.

Analisando a atividade enzimática da SPT na presença de vários detergentes, observamos que os detergentes estudados (DNA, triton CF54, nonidet P40, triton X100, tween 20 e tween 80), na concentração de 0,01%, elevaram a ligeiramente atividade da SPT na ordem de 7 - 24% em relação ao controle (Figura III.7), e o maior aumento esteve relacionado à presença de triton X100. Estudos prévios (Williams et al., 1984) demonstraram que vários detergentes (triton X100, tween 20, colato, desoxicolato, polioxietileno 9-lauril éter, octil-glicopiranosídeo e ácidos graxos) foram incapazes de substituir o palmitoil CoA como substrato da SPT. Lynch e Fairfield (1993) observaram uma redução na atividade enzimática da SPT na ordem de 66, 63 e 53%, na presença, respectivamente, de triton X100, CHAPS e octilglicosídeo, trabalhando com microssomas de plantas. Lev e Milford (1981) observaram que a incubação da SPT parcialmente purificada de bactéria, com triton X100 na concentração de 0,01%, elevou significativamente (16 - 21%) a atividade da enzima, concordando com nossos resultados. A atividade enzimática da SPT em microssomas de cerebelo de camundongo foi elevada entre 15 e 30% na presença de triton X100, nonidet P40 e tween 20 (0,01%), indicando uma associação lipídica desta enzima (Mandon et al., 1991).

Trabalhando com a enzima parcialmente purificada de *Bacterioides melaninogenicus*, Lev e Milford (1981) observaram a ação inibitória de haletos a 100 mM: iodeto foi significativamente mais inibitório que o cloreto, enquanto que o fluoreto foi relativamente não-inibitório, indicando que esta inibição pode representar uma dissociação da enzima em subunidades. Cloretos de potássio e de sódio, na concentração de 100 mM, não alteraram a atividade enzimática da SPT, trabalhando com a fração microssomal de plantas (Lynch and Fairfield, 1993). Em outro estudo, onde observamos o efeito de haletos (iodeto, fluoreto e cloreto) sobre a atividade enzimática da SPT, observamos uma leve perda da atividade enzimática na ordem de 5 - 14% (Figura III.8). Williams et al. (1984)



também não evidenciaram influência de cloreto na atividade da SPT, trabalhando com cloretos de sódio e de lítio em concentrações de 1M e cloretos de magnésio e de manganês a 1 mM.

Ao avaliarmos o efeito da hiponutrição pré e pós-natal sobre a atividade da serina palmitoiltransferase em hipotálamos de ratos, durante o período de rápido crescimento cerebral, observamos que a atividade enzimática aumenta com o desenvolvimento a partir do vigésimo-primeiro dia de gestação, até a terceira semana de vida pós-natal em ratos normonutridos. Os ratos hiponutridos não apresentaram alteração da atividade enzimática da SPT nas mesmas idades estudadas. Estes dados, quando analisados comparativamente, evidenciaram que a atividade da SPT foi menor em ratos submetidos à hiponutrição protéica pré e pós-natal a partir do sétimo dia de vida pós-natal e que esta diferença tornou-se mais acentuada aos 21 dias após o nascimento.

A atividade da enzima que atua na reação limitante da síntese dos esfingolipídios, tem por consequência a menor formação do seu produto (3-KDS), sugerindo desta forma um comprometimento da formação do “esqueleto lipídico” dos esfingolipídios, dentre eles, os gangliosídios.

Assim sendo, nossos resultados justificaram a menor quantidade de gangliosídios hipotalâmicos reportados previamente por nosso grupo (Trindade et al., 1992) e por vários outros: em cérebro total (Karlson e Svennerholm, 1978), em cérebro anterior e tronco encefálico (Merat e Dickerson, 1974), em cerebelo (Morgan and Naismith, 1982; Morgan and Winick, 1980 a,b).

Para confirmar que a rota de biossíntese dos esfingolipídios estava diminuída com hiponutrição, marcamos metabolicamente os intermediários de síntese e os produtos finais, com o precursor L-[3-<sup>14</sup>C]serina. Observamos que aos 21 dias de vida pós-natal ocorreu uma menor incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina em esfingolipídios totais de hipotálamos de ratos hiponutridos, quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Analisando os diferentes esfingolipídios (glicosilceramida, lactosilceramida, esfingomielina e gangliosídios) observamos que esta diminuição persistiu, significativamente, em todos os compostos sintetizados e marcados radioativamente, demonstrando que não só a rota de síntese dos gangliosídios está afetada pela hiponutrição, mas também todos os esfingolipídios (Tabela II.1).

Nossos resultados também mostraram uma maior incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina em glicolipídios, do que em esfingomielina, evidenciando uma maior conversão dos intermediários de síntese dos esfingolipídios para estes compostos. Estes dados concordam com o reportado por van Echten et al. (1990), trabalhando com cultura de células granulares neuronais, e com Smith e Merrill Jr. (1995), trabalhando com cultura de células J774A.1.

A banda visualizada logo acima da esfingomielina, provavelmente corresponde à esfingosina. Este composto se forma em pequena quantidade durante a rota biossintética, conforme descrito por Merrill Jr. e Wang (1982) e por Rother et al. (1992).

Reddy e Sastry (1978), usando o modelo de hiponutrição baseado no aumento do número de filhotes na ninhada, encontrou em homogenado de cérebro, uma menor incorporação de  $^{32}\text{P}$  em esfingomielina ( $P < 0,01$ ) de ratos hiponutridos de 14 dias de idade. Os mesmos autores verificaram que a incorporação de D-[1- $^{14}\text{C}$ ]glicosamina em gangliosídios foi maior nos cérebros de ratos hiponutridos de 21 dias, comparados com o grupo controle. Trindade (1993) também encontrou uma maior incorporação de [6- $^3\text{H}$ ]glicosamina em gangliosídios hipotalâmicos de ratos hiponutridos, usando o mesmo modelo de desnutrição utilizado nesta dissertação. Estes dados, obtidos através da marcação dos gangliosídios na fração glicídica, diferem dos demonstrados neste trabalho, onde marcamos a porção lipídica destes compostos com o precursor L-[3- $^{14}\text{C}$ ]serina, indicando, desta forma, que o "turnover" dos diversos precursores biossintéticos pode ser diferente nos animais normo e hiponutridos.

Analisando conjuntamente, os nossos resultados evidenciaram que a hiponutrição protéica pré e pós-natal imposta no período vulnerável do desenvolvimento cerebral, causou uma diminuição da atividade específica da serina palmitoiltransferase, a enzima limitante da síntese de esfingolipídios. Decorrente disto, observamos um comprometimento da biossíntese destes compostos, com uma menor incorporação de L-[3- $^{14}\text{C}$ ]serina nos diferentes esfingolipídios. Estes fatos poderiam contribuir para justificar que a hiponutrição protéica pré e pós-natal provoca uma redução na concentração de gangliosídios hipotalâmicos, previamente reportada por nosso grupo (Trindade et al., 1992).

O presente estudo foi o primeiro a detectar uma menor atividade da SPT em hipotálamos de ratos hiponutridos, correlacionando as alterações no conteúdo dos precursores biossintéticos dos esfingolipídios, com o retardo determinado pela hiponutrição no desenvolvimento do S.N.C.

## V - CONCLUSÕES

1 - Os parâmetros cinéticos determinados para o estudo da atividade da SPT em hipotálamos de ratos em desenvolvimento são: tempo de incubação de 20 minutos, 150 µg de proteína microsomal, concentrações de 1 mM de serina e de 0,16 mM de palmitoil CoA.

2 - No estudo das propriedades da SPT, verificamos que o tempo de congelamento da fração microsomal não altera a atividade da SPT, em pelo menos duas semanas de congelamento a -70°C; que os detergentes: desoxicolato de sódio, triton CF54, nonidet P40, triton X100, tween 20 e tween 80 elevam a atividade da SPT na ordem de 7 - 24%, sendo o triton X100 o detergente que determinou uma maior elevação na atividade específica da SPT; e que os ânions: iodeto, fluoreto e cloreto diminuíram levemente a atividade da SPT (5 - 14%).

3 - A atividade da SPT aumenta com o desenvolvimento, em ratos normonutridos, do vigésimo-primeiro dia gestacional até a terceira semana de vida pós-natal. Em ratos hiponutridos, a atividade da SPT não se altera estatisticamente nas mesmas idades estudadas.

4 - Aos 7, 14 e 21 dias de vida pós-natal, a atividade da SPT foi estatisticamente menor nos hipotálamos de ratos hiponutridos pré e pós-natalmente, quando comparados com o respectivo controle.

5 - Experimentos de incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina em esfingolipídios hipotalâmicos, têm como condições ideais a incubação de 40 mg de tecido, durante 2 horas e 30 minutos.

6 - A incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina em esfingolipídios totais de hipotálamos de ratos hiponutridos de 21 dias de idade pós-natal, foi menor que o respectivo controle.

7 - A incorporação de L-[3-<sup>14</sup>C]serina nas diferentes frações esfingolipídicas (glicosilceramida, lactosilceramida, esfingomielina e gangliosídios) foi menor em hipotálamos de ratos hiponutridos, que em animais normonutridos.

8 - A hiponutrição afeta todo o metabolismo de esfingolipídios em hipotálamos de ratos.

9 - A redução na concentração de gangliosídios hipotalâmicos, previamente reportada por nosso grupo, pode ser atribuída a alterações no conteúdo dos precursores biossintéticos de esfingolipídios, como consequência da menor atividade da SPT, detectada nos animais hiponutridos. Isto pode estar correlacionado com o atraso evidenciado no desenvolvimento do S.N.C. determinado pela hiponutrição.

## VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, C.H. Time of neuron origin in the anterior hypothalamus os rat. **Brain Research v. 154**, p.119-122, 1978.
- ALTMAN, J. and BAYER, S.A. Development of diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. **Journal of Comparative Neurology v. 182**, p.945-972, 1978.
- ALTMAN, J. and DAS, G.D. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonates rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **Journal of Comparative Neurology v.126**, p.337-389, 1966.
- AZZOLIN, I.R.; BERNARD, E.A.; TRINDADE, V.M.T.; GAMALLO. J.L. and PERRY, M.L.S. Effect of Protein Malnutrition on Glycoprotein, Protein and Lipid Synthesis in the Rat Cerebellum during the Period of Brain Growth Spurt. **Annals of Nutrition and Metabolism v.35**, p.82-88, 1991.
- BASS, N.H.; NESTKY, M.G. and YOUNG, E. Effect of neonatal malnutrition on developing cerebrum: II-Microchemical and histology study of myelin formation in the rat. **Archives of Neurology v.23**, p.303-319, 1970.
- BRAUN, P.E. and SNELL, E.E. Biosynthesis of sphingolipid bases. **Journal of Biological Chemistry v.243**, p.3775-3783, 1968.
- BRAUN, P.E.; MORELL, P. and RANDIN, N.S. Synthesis of C<sub>18</sub>- and C<sub>20</sub>-dihydrosphingosines, ketodihydrosphingosines, and ceramides by microsomal preparation from mouse brain. **Journal of Biological Chemistry v.245**, p.335-341, 1970.
- CROSKERRY, P.G.; SMITH, G.K.; SHEPARD, B.J. Perinatal brain DNA in the normal and growth hormone-treated rat. **Brain research v.52**, p.413-418, 1973.
- CRNIC, L.S. and CHASE, H.P. Modelsof infantile undernutrition in rats: effects on milk. **Journal of Nutrition v.108**, p.1755-1760, 1978.

- CUTLER, R.W.P. and DUDZINSKI, D.S. Regional Changes in Amino Acid Content in Developing Rat Brain. **Journal of Neurochemistry v.23**, p.1005-1009, 1974.
- DAVIDSON, A.N. and DOBBING, J. Myelination as a vulnerable period in brain development. **British Medical Bulletin v.22**, p.40-44, 1966.
- DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain In: **Applied Neurochemistry** A.N. DAVIDSON and J. DOBBING eds. Oxford-Blackwell, p.287-316, 1968.
- DOBBING, J. and SANDS, J. Vulnerability of developing brain. IX- The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. **Biology of Neonate v.19**, p.363-378, 1971.
- DYMSZA, H.A.; CZAJKA, D.M. and MILLER, S.A. Influence of artificial diet on weight gain and body composition of the neonatal rat. **Journal of Nutrition v.84**, p.100-106, 1964.
- FRITZ, V.M.R. and MACCIONI, H.J.F. Effects of Brefeldin A on Synthesis and Intracellular Transport of Ganglioside GT3 by Chick Embryo Retina Cells. **Jornal of Neurochemistry v.65(4)**, p.1859-1864, 1995.
- FUELLER, G.N.; JOHNSTON, D.A. and WIGGINS, R.C. The relationship between nutritional adequacy and brain myelin accumulation: a comparison of varying degrees of well fed and undernourished rats. **Brain Research v. 290**, p. 195-198, 1984.
- FUTERMAN A.H.; STIEGER, B.; HUBBARD, A.L. and PAGANO, R. Sphingomyelin Synthesis in Rat Liver Occurs Predominantly at the *cis* and *medial* Cisternae of the Golgi Apparatus. **The Journal of Biological Chemistry v.265(15)**, p.8650-8657, 1990.
- GALLER, J.R. and KANIS, K.B. Animal models of malnutrition applied to brain research In: **Current topics in nutrition and disease v.16: Basic and clinical aspects of nutrition and brain development**. RASSIN, P.K.; HABER, B.; DRUJAN, B. eds. Alan R. Liss, Inc., New York, p.57-73, 1987.

- GHOSH, T.K.; BIAN, J. and GILL, D.L. Sphingosine 1-Phosphate Generated in the Endoplasmatic Reticulum Membrane Activates Release of Stored Calcium. **The Journal of Biological Chemistry** v.269(36), p.22628-22635, 1994.
- GOVINATZKI, M.T.O.; VELLEDA, L.S.; TRINDADE; V.M.T.; NAGEL, F.M.; BUENO, D. and PERRY, M.L.S. Aminoacid methabolism by rat hippocampus during the period of brain growth spurt. **Neurochemical Research** v.12, p.23-26, 1997.
- GRIMBLE, R.F. and MANSARAY, Y.K.C. Effects in rats of dietary protein inadequacy on lactose production, milk volume and components of the lactose synthase complex (E.C. 2.4.1.22). **Annals of Nutrition and Metabolism** v.31, p.179-184, 1987.
- HAKOMORI, S.I. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. **Annual Rewiew of Biochemistry** v.50, p.733-764, 1981.
- HAKOMORI, S.I. Bifunctional Role of Glycosphingolipids. **The Journal of Biological Chemistry**, p.18713-18716, 1990.
- HANADA, K.; NISHIJIMA, M. and AKAMATSU, Y. A Temperature-sensitive Mammalian Cell Mutant with Thermolabile Serine Palmitoyltransferase for the Sphingolipid Biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry** v. 265(36), p.22137-22142, 1990.
- HANNUN, Y.A. The Sphingomyelin Cycle and Second Messenger Function of Ceramide. **The Journal of Biological Chemistry** v.269(5), p.3125-3128, 1994.
- HANNUN, Y.A. and LINARDIC, C.M. Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1154, p.223-236, 1993.
- HOLLERAN, W.M.; WILLIAMS, M.L. GAO, W.N. and ELIAS, P.M. Serine-palmitoyltransferase transferase activity in cultured human keratinocytes. **Journal of Lipid Research** v.31, p.1655-1661, 1990.
- HORWITZ, W. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. AOAC Ed., 3<sup>a</sup> ed. Washington, 1980.

- KARLSSON, I. and SVENNERHOLM, L. Biochemical development of rat forebrains in severe protein and essential fatty acid deficient. **Journal of Neurochemistry** v.31, p.657-662, 1978.
- KRIGMAN, M.R. and HOGAN, E.L. Undernutrition in the developing rat: effect upon myelination. **Brain Research** v.107, p.239-255, 1976.
- LAJTHA, A.; BARRAY-SCHWARTZ, M.; STELLA, A.M.G. Changes in brain proteins metabolism with developmental and nutritional state. In: **Current topics in nutrition and disease, v.16: Basic and clinical aspects of nutrition and brain development.** RASSIN, D.K.; HABER, B.; DRUJAN, B. eds. Alan R. Liss, Inc. New York, p.43-56, 1987.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry.** New York : Worth Publishers, p.249-251, 1996.
- LEV, M. and MILFORD, A.F. The 3-Ketodihydrospingosine Synthase of *Bacterioides melaninogenicus*: Partial Purification and Properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.212, p.424-431, 1981.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** v.193, p.265-275, 1951.
- LYNCH, D.V. and FAIRFIELD, S.R. Sphingolipid Long-Cain Base Synthesis in Plants (Characterization of Serine Palmitoiltransferase Activity in Squash Fruit Microsomes). **Plant Physiology** v.103, p.1421-1429, 1993.
- MACCIONI, H.J.F.; PANZETTA, P. and LANDA, C.A. Biosynthesis and Differentiation. In: Fidia Research Series, v.14: **New Trends in Ganglioside Research: Neurochemical and Neuroregenerative Aspects.** LEEDEN, R.W.; HOGAN, E.L.; TETTAMANTI, G.; YATES, A.J. and YU, R.K. Eds. Liviana Press, Padova, p.295-305, 1988.
- MANDON, E.C.; EHSES, I.; ROTHER, J.; van ECHTEN, G. and SANDHOFF, K. Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoiltransferase, 3-dehydrospinganine reductase and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. **The Journal of Biological Chemistry** v.267(16), p.11144-11148, 1992.

- MANDON, E.C.; van ECHTEN, G.; BIRK, R.; SCHMIDT, R.R. and SANDHOFF, K. Spingolipid biosynthesis in cultured neurons (Down-regulation of serine palmitoyltransferase by sphingoid bases). **European Journal of Biochemistry** v.198, p. 667-674, 1991.
- MEDLOCK, K.A. and MERRILL Jr., A.H. Inhibition of serine palmitoyltransferase *in vitro* and long-chain base biosynthesis in intact Chinese hamster ovary cells by  $\beta$ -chloroalanina. **Biochemistry** v.27, p.7079-7084, 1988.
- MERAT, A. and DICKERSON, J.W.T. The effect of severity and timing of malnutrition on brain gangliosides in the rat. **Biology of the Neonate** v.25, p.158-170, 1974.
- MERRILL Jr., A.H. Cell Regulation by Sphingosine and More Complex Sphingolipis. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes** v.23(1), p.83-103, 1991.
- MERRILL Jr., A.H. and JONES, D.D. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1044, p.1-12, 1990.
- MERRILL Jr., A.H.; NIXON, D.W. and WILLIAMS, R.D. Activities of serine palmitoyltransferase (3-ketosphinganine synthase) in microsomes from different rat tissues. **Journal of Lipid Research** v.26, p.617-622, 1985.
- MERRILL Jr., A.H.; SCHMELZ, E.M.; WANG, E.; SCHROEDER, J.J.; DILLEHAY, D.L. and RILEY, R.T. Role of Dietary Sphingolipids and Inhibitors of Sphingolipid Metabolism in Cancer and Other Diseases. **Journal Nutrition** v.125, p.1677S-1682S, 1995.
- MERRILL JR., A.H. and STEVENS, V.L. Modulation of protein kinase C and diverse cell functions by sphingosine - a pharmacologically interesting compound linking sphingolipids and signal transduction. **Biochimica and Biophysica Acta** v.1010, p.131-139, 1989.



- MERRILL Jr., A.H. and WANG, E. Biosynthesis of Long-Chain (Sphingoid) Bases from Serine by LM Cells (Evidence for introduction of the 4-*trans*-double bond after *de novo* biosynthesis of *N*-acylsphinganine(s)). **The Journal of Biological Chemistry** v.261(8), p.3764-3769, 1986.
- MERRILL Jr., A.H. and WANG, E. Enzymes of Ceramide Biosynthesis. **Methods in Enzimology** v.209, 427-431, 1992.
- MORGAN, B.L. and NAISMITH, D.J. The effect of early postnatal undernutrition on the growth and development of rat brain. **British Journal of Nutrition** v.48, p.15-23, 1982.
- MORGAN, B.L. and WINICK, M. Effects of administration of N-acetyl neuraminic acid (NANA) on brain NANA content and behavior. **Journal of Nutrition** v.110, p.416-424, 1980-a.
- MORGAN, B.L. and WINICK, M. Effects of enviromental stimulation on brain N-acetyl neuraminic acid content and behavioral **Journal of Nutrition** v.110, p.425-432, 1980-b.
- MORGANE, P.J.; MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, W.B.; HALL, R.; BRONZINO, J.D.; KISSANE, J.; HAWRYLEWICZ, E. and RESNICK, O. The effect of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v.2, p.137-230, 1978.
- NAGIEC, M.M.; BALTISBERGER, J.A.; WELLS, G.B.; LESTER, R.L. and DICKSON, R.C. The *LCB2* gene of *Saccharomuces* and the related *LCB1* gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.91, p.7899-7902, 1994.
- OBEID, L.M. and HANNUN, Y.A. Ceramide: A Stress Signal and Mediator of Growth Suppression and Apoptosis. **Journal of Cellular Biochemistry** v.58, p. 191-198, 1995.
- PERRY, M.L.S.; CARRASCO, M.A.; DIAS, R.D. and IZQUIERDO, I.  $\beta$ -endorphin like immunoreactivity of brain, pituitary gland and plasma rats inhibited to postnatal protein malnutrition: Effect of behavioral training. **Peptides** v.5, p.15-20, 1984.

- PERRY, M.L.S.; GAMALLO, J.L. and BERNARD, E.A. Effect of protein malnutrition on glycoprotein synthesis in rat cerebral cortex slices during the period of brain growth spurt. **Journal of Nutrition v.116**, p.2486-2489, 1986.
- PERRY, M.L.S. and IZQUIERDO, I. Effect of posttraining and pretest  $\beta$ -endorphin and ACTH administration in normal and protein malnourished rats. **Peptides v.10**, p.1117-1120, 1989.
- PERRY, M.L.S.; NETTO, C.A. and IZQUIERDO, I. Effects of ACTH, epinephrine and met-enkephalin on brain  $\beta$ -endorphin-like immunoreactivity, and of ACTH, epinephrine, met-enkephalin and naloxone on retention, in normal and in protein-malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research v.23**, p.65-72, 1990.
- RAJALAKSHEMI, R.; ALI, S.Z. and RAMAKRISHNAN, C.V. Effect of inanition during the neonatal period on discrimination learning and brain biochemistry in the albino rat. **Journal of Neurochemistry v.14**, p.28-34, 1967.
- RASSIN, D.K. Protein nutrition in the neonate: assessment and implications for brain development. In: Current Topics in Nutrition and Disease v.16: **Basic and clinical aspects of nutrition and brain development** RASSIN, D.K.; HABER, B.; DRUJAN, B. eds. Alan R. Liss, Inc., New York, p.19-39, 1987.
- RATHBUN, W.E. and DRUSE, W.I. Maternal undernutrition during lactation: Effect on amino acids in brain regions of offspring. **Journal of Neurochemistry v.45**, p.1802-1808, 1985.
- REDDY, P.V. and SASTRY, P.S. Effect of undernutrition on the metabolism of phospholipids and gangliosides in developing rat brain. **British Journal of Nutrition v.40**, p.403-411, 1978.
- RIBONI, L.; BASSI, R. and TETTAMANTI, G. Effect of Brefeldin A on Ganglioside Metabolism in Cultured Neurons: Implications for the Intracellular Traffic of Gangliosides. **Journal of Biochemistry v.116**, p.140-146, 1994.

- ROBAIN, O. and PONSOT, G. Effect of undernutrition on glial maturation. **Brain Research v.149**, p.379-397, 1978.
- ROTHER, J.; van ECHTEN, G.; SCHWARZMANN, G. and SANDHOFF, K. Biosynthesis of Sphingolipids: Dihydroceramide and not Sphinganine is desaturated by Cultured Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications v.189(1)**, p.14-20, 1992.
- ROTTA, F.T.; MELLO, C.F.; ROCHA, J.B.T. and SOUZA, D.O.G. Early undernutrition blocks the effect of naltrexone on rat exploratory behavior. **Brazilian Journal of Medical Biological Research v.21**, p. 305-312, 1988.
- SALBEGO, C. and SOUZA, D.O. Effect of undernutrition during suckling on phosphorylserine levels in brain nuclear proteins of adult rats. **Journal of Nutrition v.116**, p.2303-2310, 1986.
- SANDHOFF, K. and van ECHTEN, G. Metabolism of Gangliosides: Topology, Pathobiochemistry, and Sphingolipid Activator Proteins. **Current Topics in Membranes v.40**, p.75-91, 1994.
- SERESS, L. Postnatal neurogenesis in the rat hypothalamus. **Developmental Brain Research v.22**, p. 156-160, 1985.
- SHAYMAN, J.A. Sphingolipids: Their Role in Intracellular Signaling and Renal Growth. **Journal American Society of Nephrology v.7**, p.171-182, 1996.
- SHOEMAKER, W.J. and WURTMAN, R.J. Effect of perinatal undernutrition on metabolism of catecholamines in rat brain. **Journal of Nutrition v.103**, p.1537-1547, 1973.
- SLOB, A.K.; SNOW, C.; NATRIS-MATHOT, E. Absence of behavioral deficits following neonatal undernutrition in the rat. **Development Psychobiology v.6**, p.177-186, 1973.
- SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, I.R.; LEFKOWITZ, R.J.; HANDLER, P. and WHITE, A. **Mammalian Biochemistry**. 7 ed. Mc Graw-Hill Book Company, p. 575-622, 1983.

- SMITH, E. R. and MERRILL Jr., A.H. Differential Roles of *de Novo* Sphingolipid Biosynthesis and Turnover in the "Burst" of Free Sphingosine and Sphinganine, and Their 1-Phosphates and *N*-Acyl-Derivatives, That Occurs upon Changing the Medium of Cells in Culture. **The Journal of Biological Chemistry** v.270(32), p.18749-18758, 1995.
- SOBOTKA, T.S.; COOK, M.P. and BRODIE, R.E. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. **Brain Research** v.65, p.443-457, 1974.
- SPIEGEL, S. and MERRILL Jr., A.H. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. **Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology** v.10, p.1388-1397, 1996.
- SPIEGEL, S. and MILSTIEN, S. Sphingolipid Metabolites: Members of a New Class of Lipid Second Messengers. **Journal of Membrane Biology** v.146, p.225-237, 1995.
- STURMAN, J.A.; DEVINE, E.; RESNICK, O.; MORGANE, P.J. Maternal protein malnutrition in the rat: Effect on protein and two enzymes in the milk. **Nutrition Research** v.6, p. 437-442, 1986.
- SUDARAM, K.S. and LEV, M. Inhibition of Sphingolipid Synthesis by Cycloserina *In Vitro* and *In Vivo*. **Journal of Neurochemistry** v.42, 577-581, 1984.
- TETTAMANTI, G. and RIBONI, L. Gangliosides and Modulation of the Function of Neural Cells. **Advances in Lipid Research** v.25, 235-267, 1993.
- THUDICHUM, J.L.W. A Treatise on the Chemical Constitution of Brain. Bailliere, Tindall, and Cox, U.K., 1884. In: **Role of Dietary Sphingolipids and Inhibitors of Sphingolipid Metabolism in Cancer and Other Diseases**. MERRILL Jr.,A.H.; SCHMELZ,E.M.; WANG,E.; SCHROEDER,J.J.; DILLEHAY, D.L. and RILEY, R.T. **Journal Nutrition** v.125, p.1677S-1682S, 1995.

- TRINDADE, V.M.T.; PERRY, M.L.S. and BERNARD, E.A. Gangliosides and sialoproteins in hypothalamus of normal, postnatal and pre- and postnatal protein undernourished rats. **Journal of the Neurological Sciences** v.107, p.83-97, 1992.
- TRINDADE, V.M.T.; SCOTTI, L.; BECKER, D.; GAMALLO, J.L.; PERRY, M.L.S. and BERNARD, E.A. Undernutrition changes G<sub>D3</sub> and G<sub>M2</sub> synthase activities in developing rat hypothalamus. **Journal of Nutritional Biochemistry** v.4, p. 639-643, 1993.
- TRINDADE, V.M.T.; SCOTTI, L.; BECKER, D.; PERRY, M.L.S. and BERNARD, E.A. Undernutrition alters the hypothalamic ganglioside profile of the fetal rat. **Nutritional Biochemistry** v.6, p.155-157, 1995.
- TRINDADE, V.M.T. **Efeitos da Desnutrição Sobre o Metabolismo dos Gangliosídios Hipotalâmicos Durante o Desenvolvimento de Ratos.** Tese de Doutorado, apresentada ao curso de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Curitiba, 1993.
- VALENTE, G.B.; MATTOS, A.G.de; RUBIN, M.A.; PAZ, M.M.; TASCA, C.J. and PESSOA-PUREUR, P.R. Malnutrition increases insoluble-to-soluble tubulin ratio and in vitro incorporation of <sup>32</sup>ATP in rat cerebral cortex. **Neurochemistry International** v.21, p.595-603, 1992.
- van ECHTEN, G.; BIRK, R.; BRENNER-WEISS, G.; SCHMIDT, R.R. and SANDHOFF, K. Modulation of Sphingolipid Biosynthesis in Primary Cultured Neurons by Long Chain Bases. **The Journal of Biological Chemistry** v.265(16), p.9333-9339, 1990.
- van ECHTEN, G.; IBER, H.; SOTZ, H.; TAKTSUKI, A. and SANDHOFF, K. Uncoupling of ganglioside biosynthesis by Brefeldin A. **European Journal of Cell Biology** v.51, 135-139, 1990.
- van ECHTEN, G. and SANDHOFF, K. Modulation of ganglioside biosynthesis in primary cultured neurons. **Journal of Neurochemistry** v.52, p.207-214, 1989.

- van ECHTEN, G. and SANDHOFF, K. Ganglioside Metabolism: Enzymology, Topology and Regulation. **The Journal of Biological Chemistry** v.268(8), p.5341-5344, 1993.
- VENDITE, D.; WOFSCHUCK, S. and SOUZA, D.O. Effect of undernutrition during suckling on footbrock escape and on related neurochemical parameters. **Journal of Nutrition** v.155, 1418-1424, 1985.
- VENDITE, D.; ROCHA, R.B.T. and SOUZA, D.O. Effect of undernutrition during suckling and avoidance training on the hypothalamic  $\beta$ -endorphin of young and adult rats. **Peptides** v.9, p. 751-755, 1988.
- WANG, E. NORRED, W.; BACON, C.W.; RILEY, R.T. and MERRILL Jr., A.H. Inhibition of Sphingolipid biosynthesis by Fumonisin - Implications for Diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **The Journal of Biological Chemistry** v.226(22), 14486-14490, 1991.
- WIDDOWSON, E.H. and Mc CANCE. Some effects of accelerating growth. I- General somatic development. **Proceedings of the Royal Society of London serie B** v.162, p.188-206, 1960.
- WIGGINS, R.C.; FULLER, G. and ENNA, S.J. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter system. **Life Science** v.35, p.2085-2094, 1984.
- WILLIAM, M.A. and Mc CLUER, R.H. The use of SEP PACK<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> Cartridges during the isolation of gangliosides. **Journal of Neurochemistry** v.35(1), p.266-269, 1980.
- WILLIAMS, R.D.; SGOUTAS, D.S. and ZAATARI, G.S. Enzymology of long-chain base synthesis by aorta: induction of serine palmitoyltransferase activity in rabbit aorta during atherogenesis. **Journal of Lipid Research** v.27, p.763-770, 1986.
- WILLIAMS, R.D.; WANG, E. and MERRILL Jr., A.H. Enzymology of Long-Chain Base Synthesis by Liver: Characterization of Serine Palmitoyltransferase in Rat Liver Microsomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.228(1), p.282-291, 1984.

- WINICK, M. Nutrition and nerve cell growth. **Federation Proceedings v.29**, p.1510-1515, 1970.
- WINICK, M.; FISH, I. and ROSSO, P. Cellular recovery in rat tissues after a brief period of neonatal malnutrition. **Journal of Nutrition v.95**, p.623-630, 1968.
- WINICK, M. and NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **Journal of Nutrition v.89**, p.300-306, 1966.
- YUSUF, H.K.M. and MOZAFFAR, Z. Raised level of cholesterol esters in the brain of protein undernourished mice. **Journal of Neurochemistry v.32**, p.273-275, 1979.
- ZACHARIAS, C.; van ECHTEN-DECKERT, G.; WANG, E. MERRILL Jr., A.H. and SANDHOFF, K. The effect of fumonisin B<sub>1</sub> on chick embryos: correlation between *de novo* sphingolipid biosynthesis and gross morphological changes. **Glycoconjugate Journal v.13**, p.167-175, 1996.
- ZWEERINK, M.M.; EDISON, A.M.; WELLS, G.; PINTO, W. and LESTER, R.L. Characterization of a Novel, Potent, and Specific Inhibitor of Serine Palmitoyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry v.267(35)**, p.25032-25038, 1992.