

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**INFLUÊNCIA DE UMA DESNUTRIÇÃO
MULTIFATORIAL NA COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS
GRAXOS DE FOSFOLIPÍDIOS DO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL E FÍGADO EM DIFERENTES PERÍODOS DO
DESENVOLVIMENTO DO RATO**

SÍLVIA PATRÍCIA MENDES COSTA

Orientadoras: *Prof^a. Dra. Vera Lúcia de Menezes*
Prof^a. Dra. Maria Luíza Martins Aléssio

Recife, 2003

SÍLVIA PATRÍCIA MENDES COSTA

**INFLUÊNCIA DE UMA DESNUTRIÇÃO
MULTIFATORIAL NA COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS
GRAXOS DE FOSFOLÍPIDIOS DO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL E FÍGADO EM DIFERENTES PERÍODOS DO
DESENVOLVIMENTO DO RATO**

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado por: _____

Orientadoras:

Data: ____ / ____ / ____

**INFLUÊNCIA DE UMA DESNUTRIÇÃO
MULTIFATORIAL NA COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS
GRAXOS DE FOSFOLIPÍDIOS DO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL E FÍGADO EM DIFERENTES PERÍODOS DO
DESENVOLVIMENTO DO RATO**

Mestranda: *SÍLVIA PATRÍCIA MENDES COSTA*

Banca Examinadora: Prof^ª. Dra. Vera Lúcia de Menezes

Prof^ª. Dra. Belmira Lara Andrade da Silveira

Prof^ª. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Prof^ª. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Recife, 2003

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Sílvia Patrícia Mendes Costa** realizada em 28 de fevereiro de 2003, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 17:00 horas do dia 28 de fevereiro de 2003, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Lins, Depto. de Bioquímica/CCB, o ato da defesa de dissertação da mestranda **Sílvia Patrícia Mendes Costa**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando os trabalhos, a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, (Coordenadora do curso supra citado), fez a apresentação da aluna, de suas orientadoras, Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, e a Profa. Dra. Maria Luísa Martins Alessio, do Depto. de Fisiologia e Farmacologia/UFPE, e da Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores: Vera Lúcia de Menezes Lima, na qualidade de Presidente, Maria Tereza dos Santos Correia, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, os três do Depto. de Bioquímica, e a Profa. Dra. Belmira Lara Andrade da Silveira, do Depto. de Fisiologia e Farmacologia/UFPE. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Influência de uma Desnutrição Multifatorial na Composição dos Ácidos Graxos de Fosfolípidos do Sistema Nervoso Central e Fígado em Diferentes Períodos do Desenvolvimento do Rato**", e informou, que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A mestranda procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 35 (trinta e cinco) minutos. Após a apresentação, a Sra. Presidente concedeu um intervalo de 10 minutos. Reiniciando os trabalhos, a mesma convidou a Banca para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Belmira Lara Andrade da Silveira, que após agradecer e fazer alguns comentários, iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita, parabenizando a candidata e suas orientadoras. Em seguida, a palavra foi passada para a Profa. Maria Tereza dos Santos Correia, que fez alguns agradecimentos e comentários, iniciando sua arguição. Finda a mesma, parabenizou a aluna e suas orientadoras. Em seguida, a palavra foi passada para a Profa. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, que fez alguns agradecimentos e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora parabenizou a candidata e suas orientadoras. Prosseguindo, a Sra. Presidente usou da palavra para fazer algumas considerações e agradecimentos à aluna e à Coordenação do Curso de Mestrado em Bioquímica, convidando a Comissão a se reunir na Secretaria do Curso, para proceder o julgamento na presença da Coordenadora. Após alguns comentários, a Comissão decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros presentes. Recife, 28 de fevereiro de 2003.

Vera Lúcia de Menezes Lima
Sílvia Patrícia Mendes Costa
Belmira Lara Andrade da Silveira
Maria Tereza dos Santos Correia



José Alton de Oliveira
Secretário do Curso de
Mestrado em Bioquímica / CCB / UFPE

Aos meus pais, *Silvio e Norma*
pelo amor, incentivo e apoio
dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma importante conquista em minha vida.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Sílvio Rogério, Luís Adriano e Norma Adriana, pelo carinho, compreensão e união, pois é isso que nos torna uma verdadeira família.

Ao meu namorado, Mário Melo pelo amor, incentivo e apoio dedicados a mim.

À Dr^a Maria Luíza Aléssio pela orientação, amizade e incentivo, desde a minha iniciação científica.

À Dr^a Vera Lúcia de Menezes Lima pela orientação e amizade durante o curso.

Aos colegas de mestrado, pelo convívio e amizade, tendo comigo compartilhado tantas alegrias, dificuldades e experiências.

Aos professores do Curso de Mestrado em Bioquímica pelos conhecimentos difundidos e a oportunidade de compartilhar novos conhecimentos.

À Miron e Djalma pela amizade e apoio durante o curso.

A todos os colegas do Laboratório de Química e Metabolismo de Lipídios e Lipoproteínas da UFPE, pela atenção e companheirismo.

À Herberty di Tarso, pela amizade e convivência durante o curso.

À Mauricéia Araújo, pela amizade e inestimável apoio técnico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/COFECUB) pelos recursos liberados para a realização deste trabalho.

A todos estes e as demais pessoas que de alguma forma tenham contribuído para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE ANALÍTICO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
INTRODUÇÃO	4
OBJETIVOS	
GERAL	14
ESPECÍFICOS	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
TRABALHO A SER SUBMETIDO NO PERIÓDICO:	
British Journal of Nutrition	21
CONCLUSÕES	45

Resumo

A desnutrição durante os dois primeiros anos de vida da criança é um problema de saúde pública no Brasil, principalmente no Nordeste. A dieta básica regional (DBR), consumida na Zona da Mata de Pernambuco e deficiente em proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais provoca, no rato, um quadro de desnutrição similar ao marasmo que é prevalente na nossa região. Neste trabalho avaliamos o efeito da DBR sobre a composição dos ácidos graxos (AG) de fosfolipídios do sistema nervoso central (SNC) e fígado. O efeito da dieta foi avaliado em ratos controle e submetidos à DBR durante gestação, aleitamento e em ratos jovens alimentados com a mesma dieta materna durante gestação e aleitamento. O grupo experimental de 60 dias continuou recebendo a mesma dieta materna após o aleitamento. As membranas de córtex, hipotálamo e fígado de ratos com 2, 12, 25 e 60 dias de nascimento foram isoladas e os lipídios extraídos por solventes orgânicos. A composição de AG dos fosfolipídios das membranas foi analisada por cromatografia em fase gasosa. Nossos resultados mostram que o córtex e hipotálamo dos animais desnutridos, nas idades de 2, 12 e 25 dias não apresentaram alteração significativa nos níveis de AG mais abundantes, sobretudo os de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) de cadeia longa, ácido araquidônico (AA; 20:4n-6) e ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3), mas foi observado um aumento nesses AGPI no hipotálamo dos ratos de 25 dias. Os animais desnutridos apresentaram uma forte redução nos níveis de AA no fígado de 25 e 60 dias, acompanhada por um aumento significativo nos níveis de DHA, quando comparado ao grupo controle na mesma idade. Provavelmente essas alterações ocorreram em função da liberação da via de dessaturação, em consequência da redução significativa dos AG n-6, principalmente do ácido linoléico (18:2n-6) e AA, no grupo DBR.

Esse estudo mostra que níveis adequados de AGPI são mantidos no SNC durante a fase inicial do desenvolvimento do cérebro, apesar da dieta multideficiente, e pobre em gorduras, indicando que na DBR existem ainda níveis suficientes de AG n-3. Sendo assim, é importante que os programas de nutrição do governo brasileiro incluam estratégias relacionadas ao suprimento de AGPI para o desenvolvimento do cérebro de crianças normais.

Abstract

Epidemiological studies have implicated maternal protein-calorie deficiency as an important public health problem in underdeveloped countries, including Brazil. Common sense always links good nutrition with normal development of infants and particularly with brain development. The present study investigated the effects of a regional basic diet (RBD)-induced malnutrition on fatty acids composition of phospholipids from the central nervous system and liver in malnourished and control rats. Animals of 2, 12 and 25 days old were fed with control or multi deficient diet during gestation and suckling. The experimental group of 60 days old continued receiving the same diet used by dams. The RBD is deficient in proteins, lipids, vitamins, and minerals. Standard pellet chow (Ralston-Purina) was used to feed the control dams. Our results showed that cortex of the malnourished animals, with 2, 12 and 25 days old did not present a significant alteration on the levels of the most abundant fatty acids, especially on the long-chain polyunsaturated fatty acid (PUFA), docosahexaenoic acid (DHA; 22:6*n*-3) and arachidonic acid (AA; 20:4*n*-6), but an increase in these PUFA was observed in hypothalamus of 25 days old rats, showing a greater variation between 2 and 25 days. The ratios of 18:1*n*-9:18:0, proxies for Δ^9 -desaturase activity, was markedly higher in the liver of all age matched animals fed RBD. The ratio of 20:4*n*-6:18:2*n*-6, a proxy for Δ^6 - and Δ^5 -desaturase and elongase activity, in the liver of the dams and pups fed RBD also was higher (2-fold). The malnourished animals presented a strong reduction on liver AA levels at 25 and 60 days old, which was accompanied by significant increase in DHA level, when compared with age-matched control group. Probably, these alterations were due to discharge desaturation pathways, in consequence of a significant reduction of the fatty acids *n*-6, mainly linoleic acid (18:2*n*-6) and AA, in RBD group.

This study shows that adequate levels of PUFA are maintained in the central nervous system during the early stage of brain development, despite using the multi deficient diet-RBD. It also seems that RBD supply the animal with sufficient levels of *n*-3 fatty acids. Nevertheless, we conclude that it is highly important in Brazilian government nutrition programs the inclusion of strategy related to PUFA supply intakes for infant normal brain development.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
AG	Ácido Graxo
AGE	Ácido Graxo Essencial
AGPI	Ácido Graxo Poliinsaturado
DBR	Dieta Básica Regional
DEP	Desnutrição Energético Protéica
DHA	Ácido Docosahexaenóico
RPM	Rotação por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central

INTRODUÇÃO

I.1 Nutrição e sua importância

Para que o desenvolvimento e a organização funcional de um ser vivo ocorram normalmente, é necessária, dentre outros fatores, uma nutrição adequada, tanto em qualidade como em quantidade. Tal fator é indispensável em todas as fases do desenvolvimento do organismo, desde o período fetal até o envelhecimento. Nesse sentido, a nutrição consiste em um conjunto de processos orgânicos que envolvem a alimentação, a digestão, a absorção e o metabolismo.

A desnutrição, por sua vez, é um dos mais graves problemas sociais, principalmente em países em desenvolvimento. Quando incide em crianças, ela se constitui um problema de saúde pública, seja ocorrendo isoladamente ou associada a outros fatores que aumentam a morbidade e a mortalidade (Waterlow, 1997).

Em muitas áreas do Nordeste do Brasil, mais de 20% das crianças sofre de desnutrição de 2° ou 3° grau. De acordo com a segunda pesquisa estadual de saúde e nutrição, realizada no Estado de Pernambuco em 1998, observou-se que em todas as áreas estudadas, a desnutrição é menos prevalente no grupo de crianças menores de um ano de idade (considerando a relação peso/idade). Comparando-se a ocorrência de desnutrição severa e moderada dos menores de um ano, nos diferentes Estados, no Interior Rural foram encontrados os maiores percentuais de desnutrição em todos os graus, em praticamente todos os grupos etários (INAN/MS-IMIP, DN/UFPE-SES/PE, 1998).

I.2 Nutrição na gestação

Durante a gestação, a nutrição é determinada pela quantidade e qualidade dos nutrientes fornecidos através da placenta. Esses nutrientes, por sua vez, dependem da combinação entre a dieta e as reservas maternas dos nutrientes. O feto e a placenta são verdadeiramente dependentes do suprimento materno de ácidos graxos essenciais (AGE) para o crescimento e desenvolvimento.

Antes da gravidez, a dieta apresenta um papel importante na determinação dos níveis de AGE maternos, já que esses nutrientes fundamentais são estocados no tecido adiposo e podem ser mobilizados através da lipólise. Os fosfolipídios nos vasos da placenta e a vasculatura uterina são dependentes dos AGE supridos pela mãe para

formação de eicosanóides. Antes da concepção, a nutrição materna determina, em parte, quais as gorduras específicas acumuladas na concepção e nos tecidos placentários (Innis *et al.*, 1991; Uauy *et al.*, 1996).

Na vida fetal a desnutrição pode afetar o crescimento, como também o funcionamento de alguns órgãos e tecidos, incluindo o pâncreas endócrino, o fígado e os vasos sanguíneos. Algumas dessas alterações podem ser permanentes (Barker, 1997). Em humanos e animais, o retardo no crescimento intrauterino está associado com anormalidades comportamentais, metabólicas e fisiológicas na progênie, as quais podem surgir até na vida adulta (Lueder *et al.*, 1990).

I.3 Nutrição e sistema nervoso

Inúmeros estudos têm demonstrado que a desnutrição repercute desfavoravelmente sobre os mais variados aspectos do desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso de crianças e animais. No início da vida, o crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso estão ocorrendo com grande intensidade através dos processos de hiperplasia (aumento no número de células), hipertrofia (aumento do tamanho das células) e mielinização (Morgane *et al.*, 1978, 1993; Innis & Auestad, 2000). Durante o período de desenvolvimento e crescimento rápidos do sistema nervoso, o qual é denominado de “período crítico” ou de maior vulnerabilidade a vários tipos de agressões (Dobbing, 1968), ocorre um aumento rápido do peso cerebral, pois a neurogênese, a gliogênese, a migração neuronal e a mielinização estão no auge. A época em que ocorre o período crítico varia conforme a espécie animal. Nos seres humanos inicia-se no final do período pré-natal (último trimestre de gestação) e se estende até os primeiros anos de vida pós-natal (2 a 4 anos); já na cobaia, corresponde apenas à vida pré-natal. No cão e no rato, coincide com o período de aleitamento (Scrimshaw & Gordon, 1968).

I.4 Importância dos Lipídios

Os lipídios são os maiores componentes do cérebro, compreendem 50 a 60 % de peso seco no cérebro adulto e têm os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) de cadeia longa como seus maiores constituintes, aproximadamente 35%, entre eles os mais abundantes no cérebro dos mamíferos são o ácido araquidônico (AA; 20:4n-6) e o ácido docosahexaenóico (DHA; 22: 6n-3) (Green & Yavin, 1998). Esses AGPI são sintetizados localmente através de uma série de etapas de dessaturação e alongamento

da cadeia carbonada e uma β -oxidação, a partir de precursores obtidos na dieta, ácido linoléico (18: 2n-6) e linolênico (18: 3n-3), respectivamente (Voss *et al.*, 1991; Innis, 1993 e 1994; Innis & Deyer, 1997).

O AA e DHA podem ser obtidos diretamente de fontes dietéticas como ovos, peixe e carne, ou através de óleos. O AA é encontrado em níveis relativamente altos em muitos tecidos, enquanto que o DHA aparece em maior proporção no sistema nervoso central (SNC), e em tecidos como retina e a substância cinzenta do cérebro (Wainwright, 2002). Os AGPI de cadeia longa, principalmente o DHA, têm um papel essencial na fisiologia do cérebro e retina. Numerosos estudos indicam uma alteração na composição de ácidos graxos (AG) das membranas do cérebro, associada a amplitudes insignificantes no eletroretinograma, e diminuição do desempenho cognitivo em animais alimentados com uma dieta carente em AGPI n-3 (Connor *et al.*, 1992; Yehuda & Carosso, 1993; Carrié *et al.*, 2000).

I.5 Importância dos AGE no desenvolvimento do sistema nervoso

Durante a vida fetal, quando a organogênese e o desenvolvimento do cérebro ocorrem durante intervalos de tempo específicos e limitados, um suprimento adequado de AGE para o desenvolvimento do feto é importante. A análise de AG dos lipídios totais do cérebro e fígado fetal, indica que a demanda fetal por n-3 e n-6 é alta durante o desenvolvimento intrauterino. Durante o último trimestre de gestação, o acúmulo de AG n-3 e n-6 aumenta progressivamente com a gestação (Clandinin *et al.*, 1980; Martinez *et al.*, 1992).

Existem poucas informações sobre o requerimento mínimo absoluto para vários AGPI de cadeia longa. Em parte, isto é devido a alguns fatores como: 1) os AGPI de cadeia longa podem ser sintetizados através de seus precursores, os AGEs; 2) a concentração de vários AGPI de cadeia longa no plasma representando níveis deficientes e suficientes ainda não estão bem definidos, e 3) não existem testes clínicos estabelecidos para níveis deficientes e suficientes desses AG. Com estas dificuldades, o comportamento sensorial e motor, cognitivo e social, podem ser testados através de triagens clínicas, avaliando as ações benéficas dos AGPI de cadeia longa sobre o crescimento e desenvolvimento do cérebro (Gibson & Makrides, 2000; Carlson, 2000; Das, 2003).

A deficiência em AGE é um tipo de desnutrição, e está associada a uma piora em todos os parâmetros na desnutrição calórico-protéica severa. O aumento da atividade da Δ^9 dessaturase na relação C18:1/C18:0 e a peroxidação lipídica acentuada sem nenhuma

deficiência em AGE, poderia ser o marco inicial na desnutrição calórico-protéica (Houssaini *et al.*, 2001).

Marin & Alaniz 1998 afirmaram que “a desnutrição calórico-protéica durante a gestação e lactação afeta as atividades dessaturase dos AG, e portanto a composição em AG dos tecidos em desenvolvimento”. Esse trabalho eles demonstraram que a presença do AG 18:3n-3 na dieta materna poderia ser útil para melhorar a biossíntese de AGPI de cadeia longa, considerado como uma estratégia nutricional relacionada com o suprimento desses AG para o crescimento e desenvolvimento normal do tecido. Estudos revelam que a atividade das dessaturases catalisando a biossíntese de AG, como AA e DHA, pode ser influenciada pela quantidade e qualidade de proteínas da dieta. Conseqüentemente, a dieta protéica influencia nos níveis de AA, DHA e outros AGPI de cadeia longa n-3 e n-6 (Peluffo *et al.*, 1984). Um modelo experimental nutricionalmente balanceado foi utilizado por Ratnayake *et al.*, em 1997, para obter mais informações sobre a influência da quantidade e qualidade da dieta protéica sobre os níveis dos lipídios do soro e de AGPI em fígados de ratos. Baseados neste estudo e em observações de Koba *et al.*, (1993), os autores sugerem que uma fonte de proteína que aumenta o colesterol do soro, também pode promover a biossíntese dos AGE, AA e DHA.

O processo de dessaturação é ativado pelas enzimas Δ^6 e Δ^5 dessaturases, as quais participam em etapas equivalentes da biossíntese dos ácidos graxos, tanto da família n-3 como n-6. A enzima chave é a Δ^6 dessaturase, a qual tem mais afinidade pelo substrato com maior número de duplas ligações (Narce *et al.*, 1988; Koletzko 1992; Innis 1993 e 1994).

I.6 AGE e desenvolvimento intrauterino

O suprimento adequado de AG, a partir da circulação materna para o feto e durante o aleitamento é essencial para o crescimento e desenvolvimento ótimos no período perinatal, uma vez que a plena capacidade de dessaturação e alongamento a partir de seus precursores pelo fígado fetal e neonatal é discutível (Innis, 1991; Farquarson *et al.*, 1995; Sauerwald *et al.*, 1996). O metabolismo fetal e conseqüentemente, o crescimento fetal, dependem diretamente da passagem de nutrientes através da placenta, e portanto, a mãe deve adaptar seu metabolismo para suprir a passagem contínua de substratos (Herrera, 2002). No útero, a placenta extrai seletivamente e substancialmente AA e DHA da mãe e enriquece a circulação fetal.

Muitas evidências surgiram na última década sugerindo que as alterações na nutrição materna durante a gravidez podem afetar, irreversivelmente, aspectos funcionais fisiológicos e bioquímicos no feto (Chapman *et al.*, 2000). Estudos indicam que há uma pequena conversão placentária dos AGE precursores para AA e DHA. Similarmente, a análise da dessaturação e atividade redutase mostrou que a placenta é menos funcional do que o fígado materno ou fetal (Crawford., 2000). Durante o desenvolvimento intrauterino, no qual há um acúmulo de AGPI de cadeia longa no cérebro, desenvolve-se um mecanismo protetor do suprimento destes ácidos para o feto, consistindo no fornecimento de DHA do fígado materno para a placenta e daí para o fígado e o cérebro fetais (Crawford *et al.*, 1981).

De acordo com Green & Yavin (1995, 1998) o trato gastro-intestinal fetal pode suprir o cérebro em algumas condições, como a administração intra-amniótica de etil-docosahexaenoato (Et-DHA). Através dessa rota, o DHA é suprido independentemente do metabolismo materno, e o fígado fetal está aparentemente envolvido.

O trato gastro – intestinal pode ser útil para o suprimento de DHA em casos de insuficiência placentária materna, resultando no retardo do crescimento intra-uterino.

O cérebro fetal é capaz de metabolizar o 18:3n-3 a DHA, sem a participação do fígado fetal, contribuindo, desta forma, no acúmulo do seu próprio DHA durante um dos períodos mais decisivos do seu desenvolvimento. Os autores afirmam ainda que a administração intra-amniótica representa um caminho para o suprimento de DHA independente do metabolismo materno, mas que envolve, provavelmente, o fígado fetal.

Os estudos realizados em animais também apontam fortemente para o último período de gestação como sendo crítico para o aumento de DHA no cérebro. Foi demonstrado um maior acúmulo de todos os AG durante os últimos três dias de gestação no cérebro fetal do rato e o único AG que continuou aumentando até o nascimento foi o DHA. (Green & Yavin, 1999).

De acordo com Jumpsen & Clandinin, em 1995, no final da gravidez ocorreu um aumento de DHA no cérebro intrauterino em torno de 75%, constituindo um “pique no aumento de DHA”. Esse aumento coincide com o pico da neurogênese no feto do rato.

Trabalho de Soares *et al.*, (1995) demonstrou um aumento paradoxal nos níveis de AA em animais com dois dias de vida nascidos de mães carentes em AGE, quando comparadas aos controles. Os AGE são incorporados preferencialmente dentro dos tecidos em desenvolvimento. A partir de estudos de Crawford *et al.*, em 1989, foi observado que o aumento dos níveis de AGPI nos estágios iniciais do desenvolvimento em filhotes nascidos de mães com uma depleção em AGE poderia resultar de um

processo análogo ao aumento de AA apresentado na placenta durante a deficiência em AGE. Há também evidência da regulação pelo fígado da composição lipídica extra-hepática em animais privados em AGE. A estimulação das enzimas hepáticas Δ^5 e Δ^6 dessaturases têm sido observada em ratas grávidas deficientes em AGE (Cardot *et al.*, 1987).

A dessaturação e alongamento desses AG são realizadas no cérebro em desenvolvimento ou maduro. No entanto, o cérebro do feto de rato a termo tem a capacidade de captar, converter e esterificar seletivamente os AGE e seus derivados poliinsaturados de cadeia longa, em fosfolipídios (Green & Yavin, 1993; Moore *et al.*, 1990 e 1991).

Estudos realizados em astrócitos de cérebros em neonatais sugerem que a alongação e subsequente dessaturação Δ^6 de 24:6n-3 e 24:5n-6, limita a formação de 22:6n-3 nos astrócitos de cérebros, sugerindo que estes últimos apresentam um papel importante em fornecer AG para outras células através da secreção como ésteres de colesterol. A partir desses resultados os autores sugerem que os ésteres de colesterol e outros lipídios, secretados potencialmente com apolipoproteínas poderiam ser importantes no tráfego intracelular de colesterol e AG n-3 e n-6 essenciais e não essenciais de astrócitos para outras células neurais (Innis & Dyer, 2002).

I.7 Manipulações dietéticas, AGE e membranas biológicas

Tem sido reportado que alterações na ingestão de gordura na dieta resulta em diferenças na composição lipídica estrutural e nas funções de uma variedade de membranas (Clandinin, *et al.*, 1991).

A composição de ácidos graxos dos fosfolipídios de membrana parece estar especialmente relacionada à mudança na ingestão de ácidos graxos essenciais (AGE) pelos animais, e o balanço entre os AGE n-3 e n-6 consumidos (Hargreaves *et al.*, 1987). Entretanto, os AGE são muito importantes na dieta durante a gravidez, eles apresentam um papel crucial durante o crescimento e desenvolvimento fetal (Otto, 1997). O suprimento de AGE afeta a composição estrutural do cérebro e da bainha de mielina em particular. Em termos funcionais, essas mudanças bioquímicas induzidas pela desnutrição incluem alterações na atividade eletroencefalográfica, na resposta evocada auditiva e visual, no desenvolvimento cognitivo e motor, e em habilidades sociais (Uauy *et al.*, 2001).

Em trabalho de revisão, Salem *et al.*, (1986) demonstraram que a composição em ácidos graxos do plasma sanguíneo e fígado responde muito rapidamente às

manipulações dietéticas. Uma dieta deficiente em 18:3n-3 determina a diminuição do DHA no plasma e fígado, modificando a composição de ácidos graxos das membranas celulares e organelas do cérebro (Foot *et al.*, 1982; Bourre *et al.*, 1984; Clandinin *et al.*, 1997; Carrié *et al.*, 2000). Isto induz a uma perda dramática de DHA compensado por um aumento do ácido docosapentaenóico (22:5n-6), quando o precursor da família n-6 está disponível.

Essas alterações levam a mudanças nas propriedades físicas das membranas celulares, nas atividades enzimáticas, em receptores, assim como no transporte e interações celulares.

Os compostos lipídicos como os fosfolipídios variados e o colesterol, servem como componentes especializados das membranas celulares e organelas. A quantidade total e a composição relativa dos tipos de lipídios podem afetar a fluidez da membrana e as interações proteína/lipídio que resultam em mudanças nas funções celulares totais. A composição de AG dos lipídios estruturais da membrana pode afetar a função da membrana pela modificação na fluidez da membrana, densidade da membrana, propriedades da fase lipídica, ou pela interação dos AG com as proteínas da membrana (Stubbs & Smith, 1984; Clandinin & Jumpson, 1997; Wainwright, 2002). Sendo assim, a expressão de gene diferencial induzida pelos AGE e mudanças nas propriedades biofísicas na membrana são comumente responsáveis pelos efeitos funcionais observados (Uauy *et al.*, 2001).

Os AGPI de cadeia longa e derivados eicosanóides estão envolvidos na regulação de crescimento e diferenciação celular pela modulação da expressão gênica (Vamecq & Latruffe, 1999). Por exemplo, o efeito do DHA na maturação funcional da retina observada em diversas espécies de animais, incluindo primatas, pode ser traçada para um efeito diferente no processo de diferenciação do fotorreceptor. Estudos usando culturas primárias de células neuronais de retina têm revelado um mecanismo potencial pelo qual este nutriente essencial afeta condicionalmente a expressão gênica crítica para o crescimento do fotorreceptor e função da retina.

A partir das modificações fisiológicas ocorridas nas membranas celulares, surgem também alterações no comportamento e aprendizado nos animais (Yamamoto *et al.*, 1988; Connor *et al.*, 1992; Nakashima *et al.*, 1993; Carrié *et al.*, 2002), podendo, inclusive, estar associadas com diversas medidas no neurodesenvolvimento, como o desenvolvimento de reflexo (Wainwright *et al.*, 1991), acuidade visual (Neuringer *et al.*, 1986), e atividade exploratória (Enslin *et al.*, 1991).

Diversos estudos têm demonstrado uma associação entre níveis inadequados de DHA nos fosfolípidios do cérebro e desenvolvimento neurológico (Neuringer & Connors, 1988; Carlson *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1998; Lim & Suzuki, 1999) e redução da capacidade de aprendizagem em ratos alimentados com dieta carente em 18:3n-3 (Sastre *et al.*, 1998).

I.8 Amamentação, níveis de DHA e desenvolvimento neurológico

Os níveis de DHA e AA de crianças no nascimento estão relacionados aos níveis maternos desses AG durante a gravidez, especialmente durante o último trimestre (Connor *et al.*, 1996; Otto *et al.*, 1997). A mãe continua a suprir a criança com DHA e AA após o nascimento através da amamentação. Os níveis de DHA do leite materno são linearmente relacionados com a ingesta materna de DHA (Makrides *et al.*, 1996).

Como as mães utilizam seu DHA acumulado para suprir o feto em desenvolvimento, seus próprios níveis de DHA são comprometidos, como evidenciado pelo aumento relativo no ácido de mead (20:3n-9), um marcador da deficiência de AGE, na artéria do cordão umbilical, e mais especificamente por um aumento no índice deficiente de DHA materno (a razão do ácido docosapentaenóico 22:5n-6 para DHA no sangue) com o progresso da gravidez (Al *et al.*, 1995; Honstra *et al.*, 1989). Além disso, os níveis maternos de DHA declinam no período pós-parto, especialmente se ela está amamentando (Otto *et al.*, 1998). Os níveis relativos de AA da mãe também diminuem durante a gravidez (Al *et al.*, 1995; Arterburn *et al.*, 2000).

Em crianças amamentadas com leite materno as concentrações de DHA são maiores nos fosfolípidios do córtex cerebral quando comparadas àquelas alimentadas com leite industrializado, e demonstrou-se que as primeiras apresentam vantagens no seu desenvolvimento intelectual (Morley *et al.*, 1994; Gordon., 1997). Entre outros aspectos, essas crianças apresentam um efeito benéfico nas funções cognitivas. O leite humano é considerado uma boa forma de nutrição para crianças.

A importância dos AGPI de cadeia longa n-3 e n-6 no leite humano para o desenvolvimento normal do cérebro, especialmente durante o início da vida, tem sido enfatizada em muitos estudos (Innis, 1991; Carlson *et al.*, 1986; Birch *et al.*, 1992). O leite humano e de fórmula infantil contém os precursores dos AGE, 18:2n-6 e 18:3n-3. Os AGPI de cadeia longa AA e DHA estão naturalmente presentes no leite, mas geralmente ausentes em fórmulas infantis (Chen *et al.*, 1997).

Crianças prematuras que não são amamentadas são privadas do aumento da gordura intrauterina vital durante a gravidez tardia e deve contar com fórmulas para obter os AGE para o desenvolvimento normal, particularmente do sistema visual.

Hoffman & Uauy (1992) pesquisaram a importância dos AG n-3 em crianças prematuras submetidas à diferentes dietas suplementadas com AG n-3 e crianças que receberam leite materno. Os resultados do estudo confirmam a essencialidade dos AG n-3 em crianças prematuras na obtenção do perfil de AG, comparado a crianças que receberam leite materno. A partir dos resultados acima descritos, eles concluíram que crianças prematuras devem receber fórmulas suplementadas com AG n-3, incluindo os AGPI de cadeia longa.

De acordo com os estudos de Uauy *et al.*, (1996), a base para a essencialidade dos AG n-3 em humanos inclui não apenas evidências bioquímicas, mas também medidas funcionais associadas à deficiência em AG n-3 observada em humanos e primatas; o desenvolvimento funcional da retina e córtex occipital é afetado pela deficiência em 18:3n-3 e por uma carência em DHA em fórmulas de crianças prematuras. Sendo, portanto, os AGPI de cadeia longa n-3 considerados essenciais para a nutrição infantil. O DHA deve ser exigido por indivíduos com distúrbios hereditários metabólicos na elongação e dessaturação, como por exemplo, pacientes com desordens peroxissomais e algumas formas de retinite pigmentosa.

I.9 A Dieta Básica Regional

A partir de um modelo de desnutrição estabelecido através de inquéritos alimentares em populações economicamente desfavorecidas da Zona da Mata de Pernambuco, área de cultivo de cana-de-açúcar, o setor de Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, identificou os quatro alimentos básicos mais frequentemente consumidos. São eles, feijão mulatinho (18,34%) – *Phaseolus vulgaris*, farinha de mandioca (64,81%) – *Manioc esculenta*, batata doce (12,76%) – *Ipomoea batatas*, carne de charque (3,74%) e gordura de charque (0,35%) – carne bovina salgada e prensada e que constituíam a base da alimentação diária dessas populações. Obtidas essas informações, confeccionou-se uma dieta experimental multideficiente chamada “Dieta Básica Regional” (DBR), constituída desses mesmos alimentos e na proporção em que foram identificados no inquérito (Coutinho, 1976 & Teodósio *et al.*, 1990).

Estudos relacionados com a DBR são baseados na incidência pronunciada de diferentes estágios de desnutrição presentes naquela população, especialmente entre as crianças.

A análise bioquímica desta dieta apresentou uma deficiência em proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais (Teodósio *et al.*, 1990), proporcionando um instrumento experimental notável para o estudo da desnutrição em ratos (Monteiro *et al.*, 2001; Paixão *et al.*, 2001).

A DBR provoca, no rato, um quadro de desnutrição similar ao marasmo, que é prevalente na nossa região. Portanto, experiências utilizando a DBR foram consideradas como importantes para estudar os mecanismos das respostas funcionais, metabólicas e do sistema nervoso face à uma dieta multideficiente. Estudo preliminar realizado em nosso laboratório demonstrou que esta dieta, além de ser muito pobre em gordura total (0,3%), esta é de origem animal, sendo, provavelmente deficiente em AGE e vitamina E. Na dieta padrão, o 18:2n-6, corresponde a 2,77% dos ácidos graxos e na DBR 0,06%. No entanto, a composição relativa de 18:3n-3 é maior na DBR (Aléssio & Calumbi, 1998).

OBJETIVOS

GERAL:

Estudar, em diferentes períodos do desenvolvimento do rato, o efeito da desnutrição, comum em crianças da Zona da Mata, sobre o perfil de ácidos graxos constituintes dos fosfolipídios presentes no sistema nervoso central e fígado, o que permitirá avaliar a susceptibilidade desses constituintes à DBR.

ESPECÍFICOS:

- ❖ Determinar a composição de ácidos graxos constituintes dos fosfolipídios e membranas celulares do SNC (córtex e hipotálamo) de ratos com 2, 12, e 25 e também em animais adultos jovens, com 60 dias de vida, cujas mães foram submetidas à desnutrição primária, causada pela administração da DBR durante a gestação e aleitamento;
- ❖ Determinar a composição de ácidos graxos constituintes dos fosfolipídios e membranas celulares do fígado nesses animais;
- ❖ Comparar os dados obtidos com o ácido araquidônico (AA; 20:4n-6) no sistema nervoso central e fígado nas diferentes idades;
- ❖ Comparar os dados obtidos com o ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3) no sistema nervoso central e fígado nas diferentes idades;
- ❖ Comparar estatisticamente os resultados obtidos para o grupo desnutrido àqueles encontrados em ratos cujas mães tenham recebido dieta controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALÉSSIO M. L. M. & CALUMBI R. **Composição em ácidos graxos da dieta básica regional da Zona da mata de Pernambuco e seu efeito sobre os fosfolípídeos das membranas adenohipofisárias.** 50^a Região Anual da SBPC, 1998.

AL, M. D. M.; HOUWELINGEN, A. C.v. & KESTER, A. D. M. et al. **Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and their relationship to the neonatal essential fatty acid status.** BR. J. Nutr., 74:55-68, 1995.

ARTERBURN, L. M.; BOSWELL, K. D.; HENWOOD, S. M. & KYLE, D. J. **A developmental safety study in rats using DHA- and ARA-rich single-cell oils.** Food and Chemical Toxicology, 38: 763-771, 2000.

AUESTAD N. & INNIS S. M. **Dietary n-3 fatty acid restriction during gestation in rats: neuronal cell body and growth-cone fatty acids.** Am. J. Clin. Nutr, 71(1 Suppl): 312S-4S, 2000.

BERRY J. F.; CEVALLOS W. H. & WADE R. R. **Lipid class and fatty acid composition of intact peripheral nerve and during wallerian degeneration.** Am. Oil Chem. Soc., 42: 492-500, 1965.

BIRCH, E. E.; BIRCH, D. G.; HOFFMAN, D. R. & UAUY, R. **Retinal development in very-low-birth-weight infants fed diets differing in ω 3 fatty acids.** Invest Ophthalm. & Visual Sci., 33: 2365-2376, 1992.

BIRCH E. E; BIRCH D. & UANY R. **Visual function and the essential of α -linolenic acid and docosahexaenoic acid in human infants.** IN: YEHUDA, S.; MOSTOFSKY, D. I. (Eds.). Handbook of essential fatty acid biology. Totowa, N. Y.: Human Press, 8: 183-200, 1997.

BOURRE, J. M.; PASCAL, G.; DURAND, G. et al. **Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids.** J. Neurochem. 43, 342-348, 1984.

CARRIÉ, I.; GUESNET, P.; BOURRE, J. M. & HENRIETTE, F. **Diets containing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids affect behaviour differently during development than ageing in mice.** British Journal of Nutrition, 83: 439-447, 2000.

CARRIÉ, I.; SMIRNOVA, M.; CLÉMENT, M. et al. **Docosahexaenoic acid-rich phospholipid supplementation: effect on behavior, learning ability, and retinal function in control and n-3 polyunsaturated fatty acid deficient old mice.** Nutritional Neuroscience, 5 (1): 43-52, 2002.

CARLSON S. E.; RHODES, P. G. & FERGUSON, M. G. **Docosahexaenoic acid status of preterm infants at birth and following feeding with human milk and formula.** Am J Clin Nutr, 44: 798-804, 1986.

CARLSON S. E.; COOKE R. J. & WERKMAN S. H. **First year growth of preterm infants fed standard compared to marine oil n-3 supplemented formula.** Lipids, 27 (11):901-907, 1992.

CARLSON S. E. **Behavioral methods used in the study of long-chain polyunsaturated fatty acid nutrition in primate infants.** Am J Clin Nutr, 71 (suppl): 268S, 2000.

CHAPMAN, C.; MORGAN, L. M. & MURPHY, M. C. **Maternal and early dietary fatty acid intake: changes in lipid metabolism and liver enzymes in adult rats.** Journal of Nutrition, 130: 146-151, 2000.

CHEN, Z. Y.; KWAN, K. Y. et al. **Breast milk fatty acid composition: A comparative study between Hong Kong and Chongqing Chinese.** Lipids, 32 (10): 1061-1066, 1997.

CLANDININ M. T.; CHAPPELL J. E.; LEONG S.; HEIM T.; SWYER P. R. & CHANCE G. W. **Intrauterine fatty acid rates in human brain: implications for fatty acid requirements.** Early Hum Dev, 4: 121-129, 1980.

CLANDININ, M. T. & JUMPSSEN, J. **Fatty acid metabolism in brain in relation to development, membrane structure, and signaling.** IN: YEHUDA, S.; MOSTOFSKY, D. I. (Eds.) Handbook of essential fatty acid biology. Totowa, N. Y.: Human Press, cap. 2, p. 15-66, 1997.

CONNOR, W. E.; NEURINGER, M. & REISBICK, S. **Essential fatty acids - the importance of n-3 fatty acids in the retina and brain.** Nutr. Rev., 50: 21-29, 1992.

CONNOR, W. E.; LOWENSOHN, R. & HATCHER, L. **Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy.** Lipids, 31:S 183-187, 1996.

COUTINHO, E. M. **Relações hospedeiro/parasita na esquistosomose mansônica, em função da dieta básica regional.** Tese de livre docência, Recife, 1976.

CRAWFORD, M. **Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants.** Am. J. Clin. Nutr. 71 (1Suppl):275S-8S, 2000.

DAS, U. N.; M.D. & FAMS **Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory.** Nutrition, 19: 62-65, 2003.

FOLCH J.; LEES M. & STANLEY G. H. S. **A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.** J. Biol. Chem., 226:497-510, 1957.

GIBSON, R. A. & MAKRIDES M. **n-3 Polyunsaturated fatty acid requirements of term infants.** Am J Clin Nutr 71(suppl): 251S, 2000.

GREEN, P. & YAVIN, E. **Mechanisms of docosahexaenoic acid accretion in the fetal brain.** J. Neuroci. Res., 52:129-136, 1998.

GREEN, P.; GLOZMAN, S.; KAMENSKY, B. & YAVIN, E. **Developmental changes in rat brain membrane lipids and fatty acids: the preferential prenatal accumulation of docosahexaenoic acid.** Journal of Lipid Research, 40, 1999.

GORDON, N. **Nutrition and cognitive function.** Brain & Development 19: 165-170, 1997.

HOUSSAINI, F. Z. S.; FOULON, T. PAYEN, N.; IRAQI, M. R. et al. **Plasma fatty acid status in Moroccan children: increased lipid peroxidation and impaired polyunsaturated fatty acid metabolism in protein-calorie malnutrition.** Biomed Pharmacother, 55: 155-162, 2001.

HERRERA, E. **Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development – a review.** Placenta, 23, Supplement A, Trophoblast Research, 16, S9-S19, 2002.

INAN/MS-IMIP, DN/UFPE-SES/PE. **II PESQUISA ESTADUAL DE SAÚDE E NUTRIÇÃO/ PERNAMBUCO,** 1998.

INNIS, S. M. **Essential fatty acids in growth and development.** Prog. Lipid. Res., 30:39-103, 1991.

INNIS, S.M. & DYER, R. **Dietary triacylglycerols with palmitic acid (16:0) in the 2-position increase 16:0 in the 2-position of plasma and chylomicron triacylglycerols, but reduce phospholipid arachidonic e and docosahexaenoic acids, and alter cholesteryl ester metabolism in formula-fed piglets.** J. Nutr., 127:1311-1319, 1997.

INNIS, S. M. & AUESTAD, N. **Dietary n-3 fatty acid restriction during gestation in rats: neuronal cell body and growth-cone fatty acids.** Am. J. Clin. Nutr, 71(1 Suppl): 312S-4S, 2000.

INNIS, S. M. & DYER, R. A. **Brain astrocyte synthesis of docosahexaenoic acid from n-3 fatty acids is limited at the elongation of docosapentaenoic acid.** Journal of Lipid Research, 43, 2002.

JUANEDA P. & ROQUELIN G. **Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from heart using silica cartridges.** Lipids, 20: 239-240, 1985.

- KOBA, K.; WAKAMATSU, K. et al. Effects of dietary proteins on linoleic acid desaturation and membrane fluidity in rat liver microsomes. *Lipids*, 28: 457-464, 1993.
- LIM E SUZUKI. **Intakes of dietary docosahexaenoic acid ethyl ester and egg phosphatidylcholine improve maze-learning ability in young and old mice**, *Nutritional Neurosciences*, 1999.
- MONTEIRO, F. M. F.; LAHLOU, S.; ALBUQUERQUE, J. A. & CABRAL, A. M. S. **Influence of a multideficient diet from northeastern Brazil on resting blood pressure and baroreflex sensitivity in conscious, freely moving rats**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 271-280, 2001.
- MOORE, S. A.; YODER, E.; MURPHY, G. R. et al. **Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6n-3) and arachidonic acid (20:4n-6)**. *J. Neurochem.* 56: 518-524, 1991.
- MARÍN, M. C. & ALANIZ, M. J. T. **Relationship between dietary oil during gestation and lactation and biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in control and in malnourished dam and pup rats**. *J Nutr Biochem.*, 9: 388-395, 1998.
- MARTINEZ M. **Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development**. *J Pediatr*, 120: S129 - S138, 1992.
- MORGANE, P. J.; MILLER, M. & KEMPER, T. *et al.* **The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat**. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2: 137-230, 1978.
- MORGANE, P. J.; AUSTIN-LaFRANCE, R. J. & BRONZINO, J. D. *et al.* **Prenatal malnutrition and development of the brain**. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17: 91-128, 1993.
- MORLEY R. & LUCAS, A. **Influence of early diet on outcome in preterm infants**. *Acta Paediatr.*; (Suppl. 405): 123-126, 1994.
- NAKASHIMA, Y.; YUASA, S.; HUKAMISU, Y. et al. **Effect of a high linoleate and a high alpha-linolenate diet on general behavior and drug sensitivity in mice**. *Journal of Lipid Research*, 34: 239-247, 1993.
- NEURINGER, M.; CONNOR, W. E.; PETTEN, C. V. *et al.* **Dietary omega-3-fatty acid: deficiency and visual loss in infant Rhesus Monkeys**, *J. Clin. Invest.*, 73:272-276, 1984.
- NEURINGER, M.; CONNOR, W. E.; LIN, D. S. et al. **Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal ω 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys**. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83: 4021-4025, 1986.

- NEURINGER, M.; ANDERSON, J. & CONNOR, W. E. **The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain.** Annual Review of Nutrition 8: 517-541, 1988.
- OTTO, S. J.; HOUWELINGEN, A. & ANTAL, M. *et al.* **Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study.** Eur. J. Clin. Nutr, 51:232-242, 1997.
- PAIXÃO A. D. O., MACIEL C. R; TELES M. B. B & SILVA J. F. **Regional brazilian diet – induced low birth wieght is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age.** Biology of the Neonate 80: 239-246, 2001.
- PASCAUD M.; PHAN H. & RENARD J. L. **Transfert materno-foetal et captation des acides gras essentiels chez le rat.** Ann. Biol. Anim. Bioch. Biohys., 19:251-256, 1979.
- PELUFFO, R. O.; BOTTING, H. G. *et al.* **Effect of different amino acid diets on $\Delta 5$, $\Delta 6$ and $\Delta 9$ desaturases.** Lipids, 19: 154-157, 1984.
- RATNAYAKE, W. M. N.; SARWAR, G. & LAFFEY, P. **Influence of dietary protein and fat on serun lipids and metabolism of essential fatty acids in rats.** British Journal of Nutrition, 78: 459-467, 1997.
- SAUERWALD, T. U.; HACHEY, D. L. & JENSEN, C.L. **Effect of dietary α -linolenic acid intake on incorporation of docosahexaenoic and arachidonic acids into plasma phospholipids of term infants.** Lipids, 31:S-131-135, 1996.
- SCRIMSHAW, N. S. & GORDON, J. E. (eds.) **Malnutrition, Learning and Behaviour.** M.I.T. Press, Cambridge/MA, 1968. 566p.
- SOARES, M. C. F.; ALESSIO, M. L. M.; LEGER, C. L.; BLUET-PAJOT, M. T.; CLAUSER, H. ENJALBERT; KORDON, K. & WANDESCHEER, D. E. **Essential fatty acid deficiency effects on membrane phospholipid polyunsaturated fatty aci contents and GHRH responsiveness of rat anterior pituitary during development.** J. Lipid Res. 36, 1401-1406, 1995.
- SALEM, Jr. N.; KIM, H-Y & YERGEY, J. A. **Docosahexanoic acid: membrane function and metabolism.** In: SIMOPOULOS, A.P., MARTIN, R. (Eds.) **Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods.** New York: Academic Press, 1986. p. 263-317.
- SASTE, M. D.; CARVER, J. D.; STOCKARD, J. E. *et al.* **Maternal diet fatty acid composition affets neurodevelopment in rat pups.** J. Nutr., 128(4):740-743, 1998.

STUBBS, C. & SMITH, A. **The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function.** *Biochim Biophys Acta*, 779: 89-137, 1984.

TEODÓSIO N.R.; LAGO, E. S.; ROMANI, SAM. & GUEDES, R. **A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition.** *Arch Latinam Nutrit*, 40(4): 533-547, 1990.

UAUY, R. & HOFFMAN, D. R. **Essentiality of dietary ω 3 fatty acids for premature infants: plasma and red blood cell fatty acid composition.** *Lipids*, 27 (11): 886-895, 1992.

UAUY, R.; PEIRANO, P. & HOFFMAN, D. **Role of essential fatty acids in the function of the developing nervous system.** *Lipids*, 31:S-167-176, 1996.

UAUY, R.; HOFFMAN, D. R.; PEIRANO, P. BIRCH, D. G. & BIRCH, E. E. **Essential fatty acids in visual and brain development.** *Lipids*, 36 (9): 885-895, 2001.

VOSS, A.; REINHARD, M.; SANKARAPPA, S. & SPRECHER, H. **The metabolism of 7, 10, 13, 16, 19-docosapentaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase.** *J Biol Chem* 266: 19995-20000, 1991.

WATERLOW, J. C. **Protein-energy malnutrition: the nature and extent of the problem.** *Clinical Nutrition*, 16:3-9, 1997.

WAINWRIGHT, P. E. **Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms.** *Proceedings of the Nutrition Society*, 61: 61-69, 2002.

TRABALHO A SER SUBMETIDO NO PERIÓDICO:
BRITISH JOURNAL OF NUTRITION

INFLUENCE OF A MULTIDEFICIENT DIET IN THE FATTY ACIDS COMPOSITION OF PHOSPHOLIPIDS FROM THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND LIVER IN CRITICAL PERIODS OF RATS DEVELOPMENT

Sílvia P. M. Costa¹, Vera L. M. Lima¹, Belmira L. S. A. Costa², Claude Léger³, Maria L. M. Aléssio^{2*}

¹ Departamento de Bioquímica and

² Departamento de Fisiologia and Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-420. Recife – PE, Brazil.

³ Laboratoire de Nutrition Humaine et Atherogénèse, Faculté de Médecine – Université Montpellier 1- Montpellier, France

* Corresponding author: Dr^a Maria Luíza Martins Aléssio

Caixa Postal: 581 CDC 01, Aldeia, CEP. 50730-099

Camaragibe-PE, Brasil.

Telephone number: (81) 34591364

Telephone number: (81) 32718540

E-mail: malualessio@yahoo.com.br

Shortened version of the paper's title: Fatty acids in neural and liver membranes from malnourished rats

Abstract

Epidemiological studies have implicated maternal protein-calorie deficiency as an important public health problem in underdeveloped countries, including Brazil. Common sense always links good nutrition with normal development of infants and particularly with brain development. The present study investigated the effects of a regional basic diet (RBD)-induced malnutrition on fatty acids composition of phospholipids from the central nervous system and liver in malnourished and control rats. Animals of 2, 12 and 25 days old were fed with control or multi deficient diet during gestation and suckling. The experimental group of 60 days old continued receiving the same diet used by dams. The RBD is deficient in proteins, lipids, vitamins, and minerals. Standard pellet chow (Ralston-Purina) was used to feed the control dams. Our results showed that cortex of the malnourished animals, with 2, 12 and 25 days old did not present a significant alteration on the levels of the most abundant fatty acids, especially on the long-chain polyunsaturated fatty acid (PUFA), docosahexaenoic acid (DHA; 22:6*n*-3) and arachidonic acid (AA; 20:4*n*-6), but an increase in these PUFA was observed in hypothalamus of 25 days old rats, showing a greater variation between 2 and 25 days. The ratios of 18:1*n*-9:18:0, proxies for Δ^9 -desaturase activity, was markedly higher in the liver of all age matched animals fed RBD. The ratio of 20:4*n*-6:18:2*n*-6, a proxy for Δ^6 - and Δ^5 -desaturase and elongase activity, in the liver of the dams and pups fed RBD also was higher (2-fold). The malnourished animals presented a strong reduction on liver AA levels at 25 and 60 days old, which was accompanied by significant increase in DHA level, when compared with age-matched control group.

Probably, these alterations were due to discharge desaturation pathways, in consequence of a significant reduction of the fatty acids *n*-6, mainly linoleic acid (18:2*n*-6) and AA, in RBD group.

This study shows that adequate levels of PUFA are maintained in the central nervous system during the early stage of brain development, despite using the multi deficient diet-RBD. It also seems that RBD supply the animal with sufficient levels of *n*-3 fatty acids. Nevertheless, we conclude that it is highly important in Brazilian government nutrition programs the inclusion of strategy related to PUFA supply intakes for infant normal brain development

Introduction

Several studies including epidemiological ones have implicated maternal protein-calorie deficiency as an important public health problem in underdeveloped countries, including Brazil (Saraiva *et al.* 1992; UNICEF, 1992; Monteiro *et al.* 1992; Idohou-Dossoul *et al.* 2003; Osório *et al.* 2004). Foetal malnutrition is known to be the most significant factor for high infant and postnatal mortality rates in these countries (Wharton, 1991; Black *et al.* 2003), as well as for both preterm delivery and intra-uterine growth retardation which contribute to low birth-weight. In Pernambuco, the prevalence of low birth-weight is 8 % (Osório *et al.* 2004).

The effects of malnutrition on the developing central nervous system have been studied mainly because of the widespread incidence of infantile malnutrition and the considerable evidence that many of its effects are permanent and are associated with growth and impairments of higher mental functions, including deficit in intelligence (Auestad & Innis, 2000; Ghys *et al.* 2002). In the pre- or post-natal period, permanent effects on brain morphology, physiology, and neurochemistry are produced, and result in high impact on the nervous system functions (Morgane *et al.* 1993). During this period, developmental processes such as neurogenesis, gliogenesis and myelination are affected in different way, since that development of the central nervous system occurs in phases, which follow a precise sequence, which is different in various brain regions and even within a particular region, and varies in time from one animal species to another (Galler *et al.* 2002)

Among the nutrients required for the normal biosynthesis of cellular membranes during foetal and post-natal development, essential fatty acids (EFA) supply is important for the developing foetus, mainly when organogenesis and brain development occur during specific and limited time intervals (Wainwright, 2002). Lipids comprise 50-60% of the dry weight of the adult brain, of which approximately 35% are in the form of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA). Fatty acid analyses of total lipids from foetal brain and liver tissues indicate that demand for *n*-3 and *n*-6 is high during intrauterine development. In the last trimester of pregnancy, the quantitative accretion of *n*-3 and *n*-6 fatty acids increase progressively as gestation progresses (Martinez, 1992; Green *et al.* 1999; Herrera, 2002), and EFA linoleic acid (LA; 18:2*n*-6) and α -linolenic acid (18:3*n*-3) play a very important role. These fatty acids are precursors of their derivative PUFA, docosahexaenoic acid (DHA; 22:6*n*-3) and arachidonic acid (AA; 20:4*n*-6), as a result of the desaturation-elongation pathways (Gibson, 1999; Innis, 2003). That process occur in the mammalian organism by

enzymatic systems comprising fatty acyl-CoA synthetases, the $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases and respective elongases, and a variety of acyltransferases and transacylases to form the longer-chain derivatives (Sprecher, 2000).

18:3 n -3 deficiency is associated with altered fatty acid composition of brain cell membranes and organelles (Neuringer *et al.* 1986; Bourre *et al.* 1989) and these alterations are region-specific (Carrié *et al.* 2000). Several studies indicate that reduction in brain DHA results in loss of many sensory, behavioural, and cognitive functions both in animal and human, including loss in visual sensitivity (Weisinger *et al.* 1996; Neuringer *et al.* 1988; Pawlosky *et al.* 1997), visual acuity (SanGiovanni *et al.* 2000; Uauy *et al.* 2003), visual attention and visual recognition memory (Carlson *et al.* 1996). Therefore, EFA are of great importance in the diet of pregnant women and they play a crucial role during foetal growth and development. DHA rapidly accumulates in the brain through in utero nutrition, mother's milk, and diet during perinatal and early post-natal life (Clandinin *et al.* 1980; Martinez, 1992; Green *et al.* 1999). Foetal metabolism, and consequently, foetal growth, directly depend on the nutrients crossing the placenta, and therefore, the mother must adapt her metabolism in order to support this continuous draining of substrates. Higher DHA and AA levels in foetal plasma may involve selective placental transfer, synthesis in placental or foetal tissues, or selective foetal retention (Crawford, 2000, Herrera, 2002; Innis, 2003).

The use of experimental diets, similar in quality and quantity to those consumed by man, is attractive for assessing the effects of such diets on the nutritional status. This approach could be useful not only to minimize difficulties when the extrapolation of laboratory findings to humans is desired, but also to provide invaluable data for intervention programs to combat malnutrition. A multi-deficient diet, rich in carbohydrates but deficient in proteins, lipids, vitamins and minerals, called "Regional Basic Diet" (RBD) has been reported as a dietary model of experimental malnutrition (Teodósio *et al.* 1990), which composition is similar to nutriment utilization of people leaving in an area of sugarcane cultivation in the State of Pernambuco, Northeast of Brazil, local were exists a pronounced incidence of different stages of malnutrition, especially among the children (Coutinho *et al.* 1992). Recently, the RBD provides in our University, has emerged as a remarkable experimental tool for studying malnutrition in rats (Monteiro *et al.* 2001; Paixão *et al.* 2001). The purpose of the present study was to evaluate the extend to which the use of a multi-deficient diet RBD affect the composition of fatty acids linked to phospholipids from rat liver, hypothalamus and cerebral cortex membranes in critical periods of the animal development.

Materials and methods

Animals and tissue preparation

All experimental procedures were performed in accordance with the Society for Neuroscience ethical codes (Howard-Jones, 1985). and to the ethical requirements approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the *Centro de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Pernambuco* and it was conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1995). The mothers (Wistar rats weighing 200-250 g) were housed at 28°C on a 12 h light-dark cycle, and were allowed free access to food and fresh water *ad libitum*. The control group (n = 6) comprised offspring born from 3 dams fed standard pellet chow diet commercially available and containing 22% of a mixture with animal and soy protein (Agribandis Purina, Brazil) throughout mating, pregnancy, and lactation. The malnourished group (n = 6) was offspring of 3 dams submitted to the experimental multi-deficient diet RBD (**Table 1**), containing only 8% of a mixture with a 5:3 proportion of vegetable to animal protein (Teodósio *et al.* 1990) which ingredients were (g/g% diet): 18.34 beans (*Phaseolus vulgaris*), 64.81 manioc flour (*Manioc esculenta*), 3.74 cured meat, and 12.76 sweet potato (*Ipomoea batatas*), 0.35 meat fat, throughout mating, pregnancy and lactation.

After parturition the dams were kept in individual plastic cages. At birth, each litter was culled to 8 pups and the pups remained with their respective diets during the suckling period. After weaning (d 25), the pups of both control and malnourished groups were fed the same diets as their dams. In each dietary group, young pups at the appropriate age from two different litters were killed by decapitation under deep anaesthesia with diethyl ether on day 2, 12, 25 and 60 postpartum. Subsequently, the brain and liver were quickly removed and immediately rinsed in ice-cold saline and the hypothalamus and cerebral cortex were separated. The liver was perfuse with 10 mM phosphate-buffered saline pH 7.4 and removed. The tissues were weighed and homogenized in 10mM, Tris HCl pH 7.4 containing 1 mM EGTA. The homogenates were strained through a nylon mesh and centrifuged at 4°C and 2,500 x g for 5 min (Gillett & Lima, 1984). The cortex, hypothalamus and liver membranes in the supernatant were isolated by centrifugation at 12,000 × g for 30 min. All tissue samples were stored under argon at -20°C until lipid analysis

Fatty acids analysis

Lipids were extracted from membrane fractions according to the method of Folch *et al.* (1957). Liver, hypothalamus and cerebral cortex membrane phospholipids were separated by using silic cartridges (Sep-Pack, Waters S/A 51900) as described by Juaneda & Rocquelin (1985), and the transmethylation was carried out (Berry, 1965) in order to obtain fatty acid methyl esters (FAME) for capillary – column gas chromatography analysis in a Shimadzu apparatus (model GC14B, Japan) equipped with a Supelcowax (Supelco, USA) column (60m × 0.25mm, with 0.25µm film thickness of bonded phase). Injector and detector temperatures were at 250°C. The starting temperature of the column was 130°C. The temperature then increased to 245°C at a rate of 2.5°C/min and remained at this value for 10 min. The flow rate of the carrier gas (H₂) was 2 ml/min.

A standard fatty acid methyl esters mixture was used to identify the FAME by means of the retention times and comparing them to authenticated FAME.

Statistical *analysis*

The results were expressed as mean ± SEM, in weight percent of total fatty acids, and the significance of difference between the groups was determined by ANOVA.

Results

The results showed absence of significant differences in total saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids from cerebral cortex and hypothalamus phospholipids between control and RBD groups, with exception for reduced levels of total PUFA at 2 days in hypothalamus phospholipids (**Table 2**) and elevated $n-9+n-7/n-6+n-3$ ratio, indicating EFA reduction. Desaturase activity index (18:1 $n-9$ /18:0) was elevated in both cerebral areas in 60-day-old RBD rats, only. However, when liver phospholipids were analysed a significant reduction in PUFA was demonstrated in all studied RBD group; at 12, 25 and 60 days, significant elevation in $n-9+n-7/n-6+n-3$ ratio indicates a tendency for EFA deficiency in liver membranes. Similar increase was observed for 18:1 $n-9$ /18:0 ratio, with consequent elevation in monounsaturated fatty acid level. In spite of this, $n-3$ fatty acids were significantly elevated at 25 and 60 days. Also in RBD group, an age-dependent decrease in the 18:2 $n-6$ level was observed in all tissue analysed. In liver, LA was significantly reduced after 12 days, but in cerebral cortex and hypothalamus it was significantly reduced only after 25 days (**Table 3**). The proportion of control liver LA was 4-fold greater in 60 days old rats than in age matched RBD liver, whilst the proportion of control cortex and hypothalamus LA were 2-fold greater in 25 and 60 days old rats than those from RBD.

The levels of long-chain PUFA, DHA and AA, in cerebral cortex are maintained in malnourished groups independent of the age. However, DHA expressed a significant increase after 25-day-old in RBD hypothalamus and liver. Significant reduction was observed in liver AA level when compared to their control counterpart, after 25 days.

A comparative study of cortex and liver membranes within both control and RBD groups of the all ages reflects the maintenance of AA levels until 12 days old. However in liver, this fatty acid from RBD group was marked reduced by approximately 30% at weaning, and 60% at 60 days. Furthermore, considering the 60 days old rats from both groups the levels of AA in the cerebral cortex was equivalent to liver (Figure 1).

On the other hand, between 2 and 25 days there was an increase in DHA from cerebral cortex, it ranged from $9.17 \pm 1.49\%$ to $13.26 \pm 0.84\%$ and from $11.06 \pm 0.61\%$ to $14.13 \pm 1.40\%$ for control and RBD groups, respectively; the values were maintained until 60 days. Contrariwise, in liver it was observed a marked reduction in DHA level at 60 days old (Figure 2); this long-chain PUFA dropped by 60% in the control group, and only about half of this percentage in the RBD group.

Discussion

The findings of the present study suggest that long chain PUFA levels are maintained in central nervous system, unlike in the liver, and the cortex seems to be the main brain area protected against damage to the cell membrane lipid composition caused by using the multi-deficient diet-RBD. The experimental diet-RBD used in this work is not only deficient in protein, but also in lipids, vitamins, sodium and other minerals, and it induces a lower birth weight and considerable reduction in rat body weight, as compared to the age-matched control groups (Teodósio *et al.* 1990; Monteiro *et al.* 2001; Paixão *et al.* 2001). Nevertheless, the RBD is considered to be an isocaloric diet since its caloric adequacy was found to be comparable to that of the commercial control diet (Monteiro *et al.* 2001). Early malnutrition, such as inadequate intake of protein (Idohou-Dossoul *et al.* 2003), vitamins and minerals (Osório *et al.* 2004), in childhood leads to growth retardation, a state that is associated with increased morbidity and mortality, abnormal motor performance and coordination, as well as a reduced cognitive function and physical work capacity in adulthood. Studies over the past five decades have evaluated the effects of nutrition on central nervous system development in experimental animals and humans. There are strong evidences that reduction in energy supply and/or in several essential nutrients during the first stages of life has profound effects on the structural and functional development of the nervous system (Morgane *et al.* 1993; Uauy *et al.* 2001; Almeida *et al.* 2001).

In the present study, the age-matched offspring of mothers fed RBD diets during mating and pregnancy showed lower 18:2 n -6 levels in all studied tissues (Table 3). The reduction of 18:2 n -6 on rat liver was significant in the early stage of development when the animal was 12 days old, but in cerebral cortex and hypothalamus the decrease in 18:2 n -6 appeared later, and it was significant after 25 days old. On the other hand, the long chain PUFA, AA and DHA, were maintained in cortex and hypothalamus during all stages of the rat development (up to 60 days), except DHA in hypothalamus which was significantly increased after 25 days. Soares *et al.* (1995) demonstrated a paradoxical increase in 20:4 n -6 levels in newborns rats of malnourished mothers submitted to EFA dietary restriction and they explained by AA biomagnification which takes place in placenta (Pascaud *et al.* 1979). High DHA concentration has been found in plasma of pregnant rats (Burdge *et al.* 2002), despite a protein restriction situation. This change also can be observed when it is compared term or pre-term children (Crawford *et al.* 1997), probably by an increase of the Δ^6 -desaturase activity in the maternal liver. There is evidence for regulation by the liver of

extra hepatic lipid composition in EFA-deprived animals; stimulation of hepatic Δ^6 - and Δ^5 -desaturase has been observed in EFA-deficient pregnant rats. Alternatively, hepatic PLA₁-generated 2-acyl-lysophosphatidylcholine could supply EFA to extra hepatic tissues. Taken altogether, those arguments suggest that increased mobilization of arachidonic acid from the mother is able to compensate for consequences of EFA-deprivation in the foetus.

The synthesis of 20:4 n -6 from 18:2 n -6 is believed to involve the same Δ^6 - and Δ^5 -desaturase involved in the metabolism of the 22:6 n -3 (Sprecher *et al.* 1995; Innis & Dyer, 2002). Through of the absence of the inhibitory competition in the n -6 long chain PUFA synthesis, the low index of the 18:2 n -6 can be responsible for the increase of the n -3 way demonstrated in this work, confirming the increase of the levels of 22:6 n -3 showed in others publications (Arbuckle & Innis, 1992; Al *et al.* 1996). This maintenance occurs probably due to discharge of the desaturation pathways in consequence of significant reduction of the FA n -6, mainly 18:2 n -6 and AA. The maintenance in cerebral cortex and hypothalamus PUFA levels, in special AA and DHA, observed in this work seems to have been at expense of the liver reserves mobilization.

In the present study intra group analysis of the levels of AA and DHA in the cortex and hypothalamus shows maintenance of these PUFA during all stages of brain development in both control and RBD-malnourished animals. Considering the hypothalamus, the increase of DHA is significant with 25 days old. In addition, the present results reinforce the importance of the maternal nutrition during the suckling, taken for the maintenance of the levels of DHA in the liver from animal of both groups until 25-day-old followed by significant reduction at 60-day-old. However, in RBD group, liver DHA levels remains higher than control ones. Contrarily, AA content in liver has 32 and 61% of reduction in 25 and 60 days respectively.

The importance of n -6 and n -3 long-chain PUFA in human milk for normal brain development, especially during early life has been emphasized (Carlson *et al.* 1996; Agostoni *et al.* 2001). Cerebral cortex DHA level has been reported to be higher in breast-fed infants, and it has been related to high level of this long chain PUFA in human milk (Makrides *et al.* 1994; Saste *et al.* 1998). Recently, study from our laboratory indicate that that up to 12 days lactation the milk of the RBD-malnourished animals during gestation and suckling until 12 days old, maintain the levels of long-chain PUFA, AA and DHA, in spite of significant reduction of the precursors, 18:2 n -6 and 18:3 n -3, respectively, when compared with the control group (unpublished data).

Changes in dietary fat consumed during lactation have been shown to affect the rate of phospholipid synthesis *de novo*, the redistribution of fatty acyl chains and the activity of desaturases and elongases (Loor *et al.* 2003).

DHA is important for neuronal function because its deficiency leads to many behavioural and functional deficits. In previous studies, Salem *et al.* (2002) reported that loss of brain DHA leads to a reduction in neuronal size in regions of the hippocampus. In addition, other researchers used more extreme conditions of *n*-3 FA deficiency, in which both DHA and its precursor linolenic acid were eliminated or severely limited for three generations. Under these conditions, Ahmad (2002) showed that other areas of the brain also revealed a similar decrease in the neuron size accompanied by brain DHA deficiency. Recent evidence in RBD-malnourished rats during gestation and lactation indicates that somatic size of NPY-immunoreactive cells did not differ significantly among control and malnourished animals and distribution of NPY-containing fibres in the central nervous system was not modified by the RBD-induced malnutrition during brain development (Vilela *et al.* 2004), probably by DHA conservation demonstrated in this results.

Even, considering the RBD low protein contents that was associated with a lower hepatic Δ^5 -desaturase, responsible for AA and EPA (20:5*n*-3) formation (Marin & Alaniz, 1998) we can suppose that RBD have sufficient *n*-3 precursors to guarantee the adequate levels of *n*-3 long chain PUFA, since the DHA in RBD liver remains higher than that in control groups at the same age. Moreover, 22:5*n*-6 was elevated in RBD liver at 12, 25 and 60 days, probably due to DHA mobilization for brain. In view of the high demand of PUFA *n*-3 and *n*-6 during the brain developing, we can not discard the importance of their synthesis in foetal tissues (Yago *et al.* 2004), such as liver and brain (Al *et al.* 1996; Salem *et al.* 1996; Green & Yavin, 1998). Many studies relate the limited capacity of the foetal liver to the elongation and desaturation of the fatty acids 18:2*n*-6 and 18:3*n*-3 (Poisson *et al.* 1993; Rodriguez *et al.* 1998).

The results shown in Table 2 indicate that RBD-malnutrition did not affect all regions in a similar manner. Hypothalamus of 2 days pups from RBD dams, presents significant lower levels of both AA and DHA, differently from cortex at same age. This differential changes suggest an specific modification, probably by functional activities of membrane proteins related to age. It is important to consider that membranes display a reasonable degree of homeostasis and changes in the proportion of several major fatty acids are associated to some metabolic compensation in order to maintain plasma membrane fluidity within a certain range of values (Scislowski *et al.* 2004).

Marteinsdottir *et al.* (1998), demonstrated specific changes with different oil enriched diets, and hypothalamus was the region least susceptible. Nevertheless, they worked with adults rats, receiving standard diet with different fatty acid composition.

In conclusion, maintenance of PUFA levels exists in central nervous system, in spite of using the multideficient diet RBD, and the neural membranes composition under these dietary conditions point to specific characteristics of the attained structures. Besides, the maintenance of PUFA in the nervous system can be, probably, by compensatory mechanisms, as already observed in others tissues (Aléssio *et al.* 1994). On the other hand, preliminary studies in our laboratory point to relative elevated concentrations of the *n*-3 series, in RBD itself, indicate the existence of sufficient levels of *n*-3, but not *n*-3 FA, in RBD. Finally, by these observations we suggest that it is highly important a government policy action given high priority to national nutrition programmes including strategy related to PUFA supply intakes for infant normal growth and brain development, particularly because of concern regarding the adverse functional effects of RBD on neuro-cognitive development in northeast Brazil.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq n° 521340/96-9, N° 478855/2003-6; MCT/CNPq/PADCT n° 620057/2004-1), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/COFECUB n° 296-99/I).

References

- Agostoni C, Marangoni F, Lammardo AM, Giovannini M, Riva E & Galli C (2001) Breastfeeding duration, milk fat composition and developmental indices at 1 year of life among breastfed infants. *Prostag Leukotr Ess* **64**, 105-109.
- Ahmad A, Murthy M, Greiner RS, Moriguchi T & Salem JrN (2002) A decrease in cell size accompanies a loss of docosahexaenoate in the rat hippocampus. *Nutr Neurosci* **5**, 103-113
- Al MDM, Badart-Smook A, Houwelingen ACV, Hasaart THM & Hornstra G (1996) Fat intake of women during normal pregnancy: relationship with maternal and neonatal essential fatty acid status. *J Am Coll Nutr* **15**, 49-55.
- Aléssio MLM, Léger CL, Rasolonjanahary R, Wandscheer DE, Clauser H, Enjalbert A & Kordon C (1994) Selective effect of a diet-induced decrease in the arachidonic acid membrane phospholipid content on in vitro phospholipase C or adenylate cyclase-mediated pituitary response to angiotension II. *Neuroendocrinology* **60**, 400-409.
- Almeida MFL, Yamasaki EN, Silveira ACD, Guedes RCA & Hokoç JN (2001) The GABAergic and cholinergic systems in the retina are differentially affected by postnatal malnutrition during the suckling period. *Nutr Neurosci* **4**, 223-238;
- Arbuckle LD & Innis SM (1992) Docosahexaenoic acid in developing brain and retina of piglets fed or low α -linoleic formula with and without fish oil. *Lipids* **27**, 89-93.
- Auestad N & Innis SM (2000) Dietary *n*-3 fatty acid restriction during gestation in rats: neuronal cell body and growth-cone fatty acids. *Am J Clin Nutr* **71** (Suppl 1), 312S-4S.
- Berry JF, Cevallos WH & Wade RR (1965) Lipid class and fatty acid composition of intact peripheral nerve and during Wallerian degeneration. *Am Oil Chem Soc* **42**, 492-500.
- Black RE, Morris SS & Bryce J (2003) Where and why are 10 millions children dying every year. *Lancet* **361**, 2226-2234.
- Bourre JM, Durand G, Pascal G & Youyou A (1989) Brain cell and tissue recovery in rats made deficient in *n*-3 acids by alteration of dietary fat. *J Nutr* **119**, 15-22.

- Burdge GC, Dunn RL, Wootton SA & Jackson AA (2002) Effect of reduced protein intake on hepatic and plasma essential fatty acid concentration in the adult female rat: effect of pregnancy and consequences for accumulation of arachidonic and docosahexaenoic acids in fetal liver and brain. *Brit J Nutr* **88**, 379-387.
- Burdge GC, Delange E, Dubois L, Dunn RL, Hanson MA, Jackson AA & Calder PC (2003) Effect of reduced maternal protein intake in pregnancy in the rat on the fatty acid composition of brain, liver, plasma, heart and lung phospholipids of the offspring after weaning. *Brit J Nutr* **90**, 345-352.
- Carlson SE, Ford AJ, Werkman SH, Peeples JM & Koo WW (1996) Visual acuity and fatty acid status of term infants fed human milk and formulas with and without docosahexaenoate and arachidonate from egg yolk lecithin. *Pediatr Res* **39**, 882-888.
- Carrié I, Clément M, de Jave, D, Francès H & Bourre J-M (2000) Specific phospholipids fatty acid composition of brain regions in mice: effects of *n*-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipids supplementation. *J Lipid Res* **41**, 465-472.
- Clandinin MT, Chappell JE, Leong S, Heim T, Swyer PR & Chance GW (1980) Intrauterine fatty acid rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev* **4**, 121-129.
- Crawford M (2000) Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. *Am J Clin Nutr* **71** (Suppl 1), 275S-8S.
- Coutinho EM, Freitas LPCG & Abath FGG (1992) The influence of the regional basic diet from northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop* **25**, 13-20.
- Folch J, Lees M & Stanley GHS (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-510.
- Galler JR, Morgane PJ & Mokler DJ (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav R* **26**, 471-483.
- Gibson RA (1999). Long-chain polyunsaturated fatty acids and infant development. *Lancet* **354**, 1919.
- Gillett MPT & Lima VLM (1984) Alterations of cell membrane composition during prolonged fasting in lizards. *Biochim Biophys Acta* **796**, 219-225.
- Green P & Yavin E (1998). Mechanisms of docosahexaenoic acid accretion in the fetal brain. *J Neurosci Res* **52**, 129-136.

- Green P, Glozman S, Kamensky B & Yavin E (1999) Developmental changes in rat brain membranes lipids and fatty acids: the preferential prenatal accumulation of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res* **40**, 960-966.
- Herrera E (2002) Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development – a review. *Placenta* **23, 16**: S9-S19.
- Howard-Jones N (1985) A CIOMS ethical code for animal experimentation. *WHO Chron* **39**, 51-56.
- Idohou-Dossoul N, Wade S, Guirol AT, Sarr CS, Diaharn B, Cissé D, Beaut J-P, Chappuis P, Hoffman D & Lemonnier D (2003) Nutritional status of preschool Senegalese children: long-term effects of early severe malnutrition. *British Brit J Nutr* **90**, 1123-1132.
- Innis SM (2003) Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr* **143**, S1-S8.
- Innis, S. M. & Deyer RA (2002) **Brain astrocyte synthesis of docosahexaenoic acid from n-3 fatty acids is limited at the elongation of docosapentaenoic acid.** *Journal of Lipid Research*, 43.
- Juaneda P & Roquelin G (1985) Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from heart using silica cartridges. *Lipids* **20**, 239-240.
- Loor JJ, Lin X & Herbein JH (2003) Effects of dietary *cis* 9, *trans* 11-18: 2, *trans* 10, *cis* 12-18: 2, or vaccenic acid (*trans* 11-18: 1) during lactation on body composition, tissue fatty acid profiles, and litter growth in mice. *Brit J Nutr* **90**, 1039-1048.
- Makrides M, Neumann MA, Byard RW, Simmer K & Gibson RA (1994) Fatty acid composition of brain, retina and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. 60, 189-194.
- Marin MC & Alaniz MJT (1998) Relationship between dietary oil during gestation and lactation and biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in control and malnourished dam and pup rats. *J Nutr Biochem* **9**, 388-395.
- Marteinsdottir I, Horrobin DF, Stenfors C, Theodorsson E & Mathé A (1998) Changes in dietary fatty acids alter phospholipids fatty acid composition in selected regions of rat brain. *Prog Neuro-Psychoph* **22**, 1007-1021.
- Martinez M (1992) Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* **120**, S129 - S138.
- Monteiro CA, Benicio MH, Iunes R, Gouveia NC, Taddei JA, Cardoso MA (1992) Nutritional status of Brazilian children: trends from 1975 to 1989. *Bull World Health Organ* **70**, 657-666.

- Monteiro FMF, Lahlou S, Albuquerque JA & Cabral AMS (2001) Influence of a multideficient diet from northeastern Brazil on resting blood pressure and baroreflex sensitivity in conscious, freely moving rats. *Braz J Med Biol Res* **34**, 271-280.
- Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T & Galler JR (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav R* **17**, 91-128
- Neuringer M, Connor WE, Lin DS, Barstad L & Luck S (1986) Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci* **83**, 4021-4025.
- Neuringer M, Anderson J & Connor WE (1988) The essentiality of *n*-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Annu Rev Nutr* **8**, 517-541.
- Osório MM, Lira PC & Ashworth A (2004) Factors associated with Hb concentration in children aged 6-59 months in the State of Pernambuco, Brazil. *Brit J Nutr* **91**, 307-314.
- Paixão ADO, Maciel CR, Teles MBB & Silva JF (2001) Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. *Biol Neonate* **80**, 239-246.
- Pascaud M, Phan H & Renard JL (1979) Transfert materno-foetal et captation des acides gras essentiels chez le rat. *Ann Biol Anim Bioch Biohys* **19**, 251-256.
- Pawlosky RJ, Denkins Y, Ward G & Salem JrN (1997) Retinal and brain accretion of long-chain polyunsaturated fatty acids in developing felines: the effects of corn oil-based maternal diets. *Am J Clin Nutr* **65**, 465-72.
- Poisson JP, Dupuy RP, Sarda P, Descomps B, Narce M, Rieu D & Crastes de Paulet A (1993) Evidence that liver microsomes of human neonates desaturate essential fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **1167**, 109-113.
- Rodriguez A, Sarda P, Nessman C, Boulot P, Leger C L, Descomps B (1998) Δ 6 and Δ 5-desaturase activities in the human fetal liver: kinetics aspects. *J Lipid Res* **39**, 1825-1832.
- Salem N Jr, Wegher B, Mena P & Uauy R (1996) Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. *Proc Natl Acad Sci* **93**, 49-54.
- Salem JrN, Ahmad A & Moriguchi T (2002) Decrease in neuron size in docosahexaenoic acid-deficient brain. *Pediatr Neurol* **26**, 210-218.

- SanGiovanni JP, Berkey CS, Dwyer JT & Colditz GA (2000) Dietary essential fatty acids, long-chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: a systematic review. *Early Hum Dev* **57**, 165-188.
- Saraiva LR, Brindeiro Filho D & Nora AD (1992) The heart in the child with severe protein-calorie malnutrition. *Arq Bras Cardiol* **58**, 353-357.
- Scislowski V, Durand D, Gruffat-Mouty D, Motta C & Bauchart D (2004) Linoleate supplementation in steers modifies lipid composition of plasma lipoproteins but does not alter their fluidity. *Brit J Nutr* **91**, 575-584.
- Soares MCF, Aléssio MLM, Léger CL, Bluet-Pajot MT, Clauser C, Enjalbert A, Kordon C & Wandscheer DE (1995) Effect of essential fatty acid deficiency on the membrane fatty acid content and growth hormone stimulation of rat pituitaries during postnatal development. *J Lipid Res* **36**, 1401-1406.
- Sprecher H, Luthria DL, Mohammed BS & Baykousheva SP (1995) Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* **36**, 2471-2477.
- Sprecher H (2000) Metabolism of highly unsaturated *n*-3 and *n*-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **1486**, 219-231.
- Teodósio NR, Lago ES, Romani S & Guedes R (1990) A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* **40**, 533-547.
- Uauy R, Mena P & Peirano P (2001) Mechanisms for nutrient effects on brain development and cognition. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme* **5**, 41-70
- Uauy R, Hoffman DR, Mena P, Llanos A & Birch E (2003) Term infants studies of DHA and ARA supplementation on neurodevelopment: results of randomized controlled trials. *J Pediatr* **143**, S17-S25.
- Vilela MCR, Mendonça JEF, Bittencourt H, Lapa RM, Alessio MLM, Costa MSMO, Guedes RCA, Silva VL, Costa BLSA (2003). Differential vulnerability of the rat retina, suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet to malnutrition induced during brain development. Artigo submetido à publicação no Brain Research Bulletin (BRB 3229).
- Voss A, Reinhard M, Sankarappa S & Sprecher H (1991) The metabolism of 7, 10, 13, 16, 19-docosapentaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem* **266**, 1995-2000.

- Wainwright PE (2002) Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proceedings of The Nutrition Society* **61**, 61-69.
- Weisinger HS, Vingrys AJ & Sinclair AJ (1996). Effect of dietary *n*-3 deficiency on the electroretinogram in the guinea pig. *Ann Nutr Metab* **40**, 91-8.
- Yago MD, Diaz RJ, Ramirez R, Martinez MA, Manas M & Martinez-Victoria E (2004) Dietary-induced changes in the fatty acid profile of rat pancreatic membranes are associated with modifications in acinar cell function and signalling. *Brit J Nutr* **91**, 227-234.

Table 1. Composition of diets (g/g % diet)

	Standard diet¹	Multideficient diet²
Protein	23.00	8.87
Carbohydrates	41.00	77.70
Ether extract	2.50	1.12
Fibers	9.00	7.00
Minerals	8.00	3.96
Vitamin supplement	Yes	No
Sodium	0.37	0.17
Calcium	1.80	0.25
Phosphorus	0.80	0.08
Kcal / 100g	278	356

¹ As indicated by the manufacturer (Ralston-Purina)

²According to the Laboratory of Experimentation and Analysis of Food (LEAAL), Nutrition Department/UFPE, Recife, Brazil.

Table 2- Fatty acid composition of cerebral cortex, hypothalamus and liver membrane phospholipids from rats fed multi-deficient diet-RBD.

Fatty acid	CORTEX							
	2 days		12 days		25 days		60 days	
	Control	RDB	control	RDB	Control	RDB	Control	RDB
Saturated	48.13±1.8	47.47±1.5	44.57±2.6	44.85±2.3	47.54±5.1	43.13±0.7	46.39±7.3	39.61±2.5
Monounsaturated	18.98±1.5	18.16±1.5	14.14±1.0	14.50±0.4	15.84±1.6	16.05±0.2	17.74±1.2	19.45±0.7
Polyunsaturated	28.79±3.9	29.42±2.0	33.92±2.5	33.29±2.2	31.60±2.2	31.78±0.9	29.16±1.2	29.89±2.4
Total n-6	19.05±2.1	17.40±1.0	20.52±1.6	20.45±1.5	18.07±1.7	17.13±0.5	15.84±1.4	14.85±1.2
Total n-3	9.62±1.9	11.79±1.0	13.22±1.5	12.54±0.8	13.45±0.9	14.58±0.5	13.21±1.2	14.61±1.1
n-9+n-7/n-6+n-3^a	0.68±0.14	0.63±0.09	0.43±0.06	0.45±0.03	0.51±0.08	0.51±0.02	0.61±0.04	0.68±0.08
18:1n-9/18:0^b	0.59±0.07	0.58±0.06	0.50±0.06	0.51±0.03	0.53±0.06	0.57±0.01	0.59±0.09	0.70±0.04*
	HYPOTHALAMUS							
	2 days		12 days		25 days		60 days	
	Control	RDB	control	RDB	Control	RDB	Control	RDB
Saturated	49.22±2.5	57.11±7.9	46.71±2.1	45.09±4.2	46.49±8.7	42.42±1.5	47.34±9.2	38.95±0.3
Monounsaturated	18.18±0.3	19.02±2.4	15.70±0.5	17.03±1.9	19.18±2.4	18.30±0.6	23.36±1.2	22.58±0.1
Polyunsaturated	30.65±4.5	20.52±4.7*	30.64±2.6	30.65±3.6	26.34±3.6	29.76±0.8	25.35±3.9	27.36±1.4
Total n-6	20.11±2.4	13.80±3.2*	18.81±2.0	18.15±2.9	15.85±1.5	16.39±0.5	13.60±1.3	13.43±0.1
Total n-3	10.33±2.2	6.72±1.5*	11.68±0.8	12.10±0.9	10.26±2.0	13.29±0.2*	11.70±2.6	13.61±1.0
n-9+n-7/n-6+n-3	0.61±0.10	0.95±0.19*	0.52±0.06	0.58±0.12	0.76±0.15	0.62±0.02	0.95±0.20	0.85±0.03
18:1n-9/18:0	0.48±0.08	0.45±0.10	0.55±0.01	0.56±0.06	0.57±0.14	0.59±0.05	0.62±0.16	0.86±0.01*
	LIVER							
	2 days		12 days		25 days		60 days	
	Control	RDB	control	RDB	Control	RDB	Control	RDB
Saturated	43.97±1.6	44.85±1.2	43.80±1.3	43.89±0.9	45.14±3.4	45.07±1.2	40.38±3.8	46.08±3.4*
Monounsaturated	9.40±1.5	10.93±1.0	5.21±0.16	9.68±2.10*	7.55±0.4	13.99±1.5*	7.52±1.2	17.51±0.5*
Polyunsaturated	46.12±2.8	42.70±2.1*	49.89±1.7	45.64±2.5*	46.97±3.3	40.11±1.9*	51.66±3.9	35.70±2.9*
Total n-6	30.58±1.0	26.70±1.4	35.34±0.9	29.47±1.1*	33.34±2.1	21.02±1.4*	44.61±2.4	17.06±0.9*
Total n-3	15.42±2.0	15.83±1.2	14.55±0.8	15.92±1.8	13.62±1.4	18.06±0.9*	7.00±2.0	15.75±1.6*
n-9+n-7/n-6+n-3	0.21±0.05	0.26±0.04	0.10±0.01	0.22±0.06*	0.16±0.02	0.39±0.06*	0.15±0.03	0.62±0.03*
18:1n-9/18:0	0.27±0.05	0.32±0.06	0.14±0.01	0.34±0.1*	0.18±0.02	0.42±0.07*	0.17±0.04	0.55±0.05*

^a EFA deficiency index . ^b Δ^9 desaturase activity

* Mean values significantly different from those provided by standard diet (P<0.05).

Table 3. Phospholipid fatty acid composition in cerebral cortex, hypothalamus and liver from rats of deficient (control) or on multi deficient group. Values are % of total fatty acids, mean \pm SEM of 4 -6 rats per group.

		18:2n-6		20:4n-6		22:6n-3	
Group		Control	RBD	Control	RBD	Control	RBD
Cortex	2 days	1.15 \pm 0.33	0.85 \pm 0.10	11.37 \pm 1.48	11.65 \pm 1.08	9.17 \pm 1.49	11.06 \pm 0.61
	12 days	0.97 \pm 0.23	0.70 \pm 0.14	14.18 \pm 1.00	14.58 \pm 1.16	12.94 \pm 1.55	12.28 \pm 0.75
	25 days	0.85 \pm 0.10	0.42 \pm 0.05*	12.25 \pm 1.58	11.82 \pm 0.23	13.26 \pm 0.84	14.46 \pm 0.54
	60 days	0.71 \pm 0.13	0.24 \pm 0.01*	10.64 \pm 0.99	10.28 \pm 1.04	12.72 \pm 1.29	14.13 \pm 1.40
Hypothalamus	2 days	1.02 \pm 0.17	0.71 \pm 0.05*	11.83 \pm 1.72	7.77 \pm 1.82 *	9.61 \pm 1.68	6.42 \pm 1.21*
	12 days	0.73 \pm 0.22	0.65 \pm 0.31	11.90 \pm 1.01	11.94 \pm 1.98	11.46 \pm 0.86	11.31 \pm 1.81
	25 days	0.68 \pm 0.11	0.31 \pm 0.02*	9.42 \pm 1.24	10.21 \pm 0.44	10.13 \pm 1.99	13.15 \pm 0.28*
	60 days	0.54 \pm 0.08	0.28 \pm 0.01*	7.92 \pm 1.14	7.64 \pm 0.05	10.84 \pm 1.91	12.68 \pm 0.28*
Liver	2 days	7.25 \pm 0.38	6.24 \pm 0.38	20.60 \pm 1.13	18.04 \pm 1.49	13.56 \pm 1.75	13.71 \pm 1.14
	12 days	11.99 \pm 0.12	6.65 \pm 0.51*	20.44 \pm 0.63	19.75 \pm 1.04	12.08 \pm 0.56	13.65 \pm 1.70
	25 days	11.53 \pm 0.97	4.40 \pm 0.76*	20.06 \pm 1.57	13.63 \pm 0.86*	11.66 \pm 1.32	15.46 \pm 0.67*
	60 days	16.46 \pm 1.61	4.59 \pm 0.47*	25.66 \pm 3.39	9.93 \pm 1.36*	5.20 \pm 1.88	9.96 \pm 1.03*

* Values significantly different from those provided by standard diet (P<0.05).

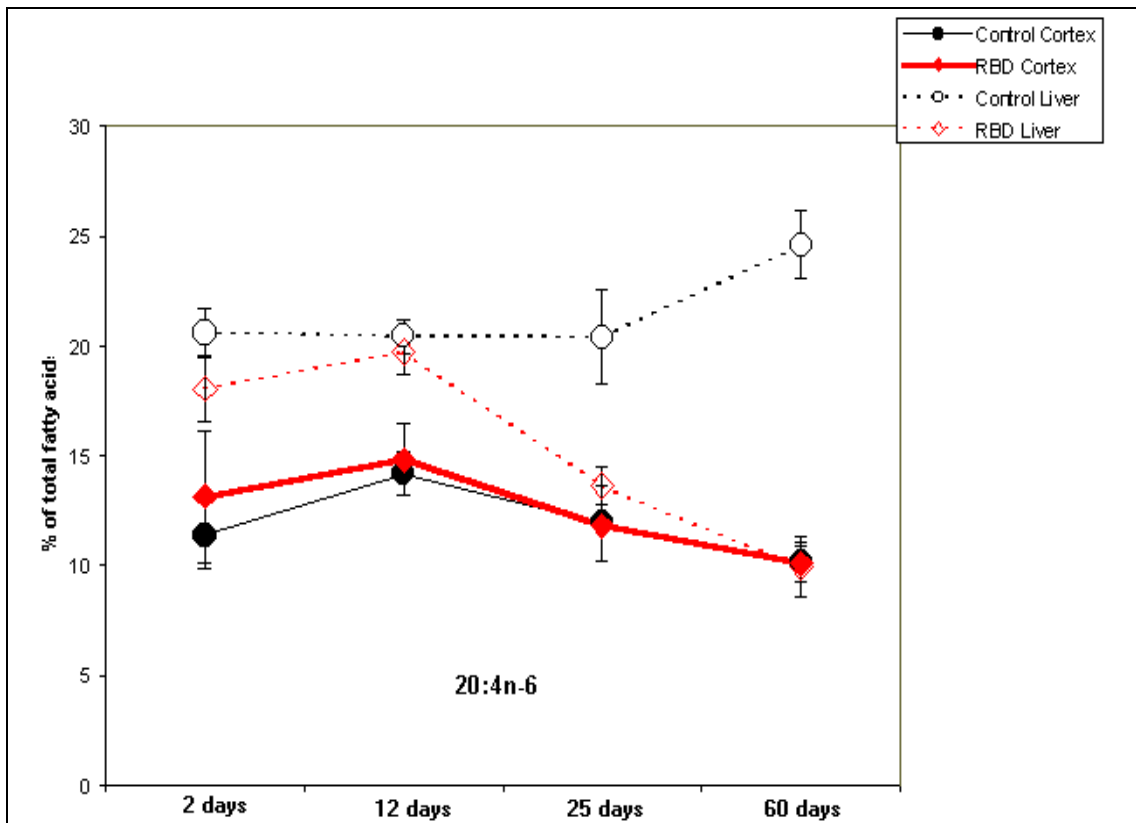


Figure 1. Effect of multi-deficient diet-RBD on phospholipid's long-chain fatty acid composition from cortex and liver membranes in relation to rat age. Percentage of arachidonic acid (20:4*n*-6).

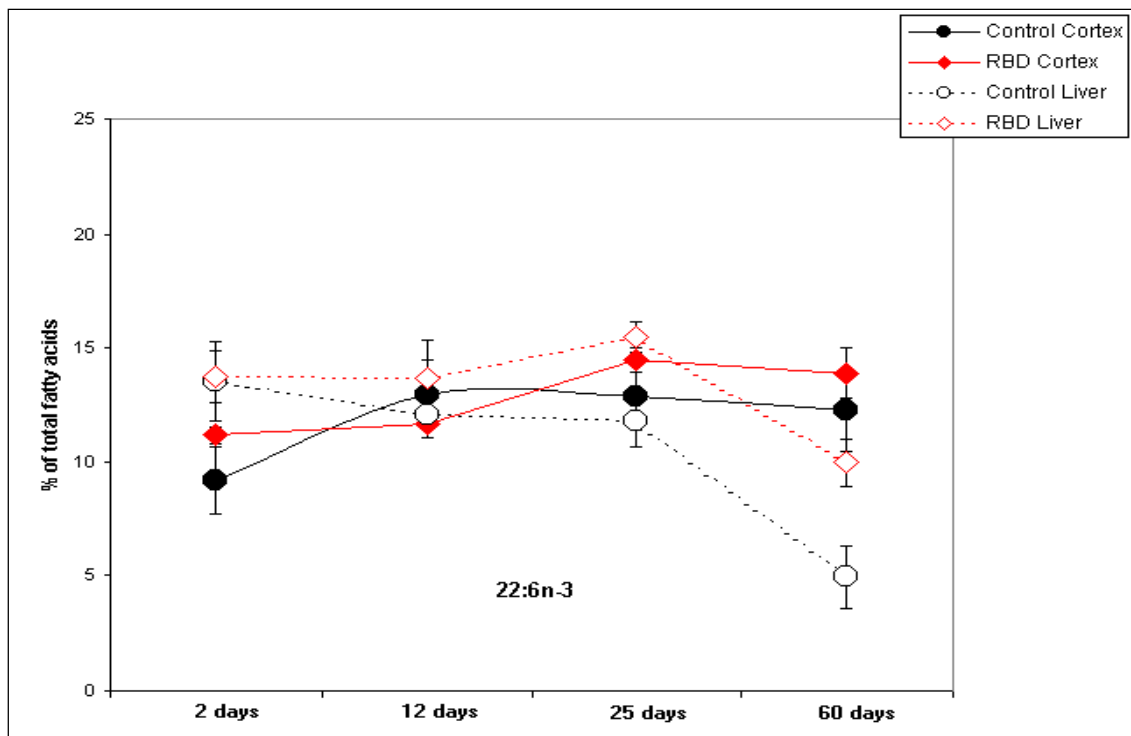


Figure 2. Effect of multi-deficient diet-RBD on phospholipid's long-chain fatty acid composition from cortex and liver membranes in relation to rat age. Percentage of docosahexaenoic acid (22:6n-3).

CONCLUSÕES

- ❖ Ocorre uma manutenção nos níveis de AGPI n-6 e n-3 no córtex e hipotálamo de ratos desnutridos com uma tendência a níveis mais elevados de n-3;
- ❖ Os AG n-6 no fígado de ratos desnutridos apresentam uma drástica redução entre 12 e 60 dias de vida;
- ❖ Após o desmame ocorre uma redução significativa nos níveis de DHA do fígado nos grupos controle e desnutrido e, a partir de 25 dias de idade esse ácido graxo apresenta valores significativamente mais elevados no grupo DBR;
- ❖ A DBR apresenta níveis suficientes de AGPI n-3 para manutenção do metabolismo no sistema nervoso central até a idade adulta;
- ❖ Existe uma mobilização das reservas hepáticas, as quais podem ser fonte de AGE para manutenção dos níveis de DHA e AA no sistema nervoso central dos animais desnutridos.